

PCT/JP99/06076
0928309947

FEU

日本特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

RECD 21 JAN 2000
WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年10月30日

JP99/6076

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第311408号

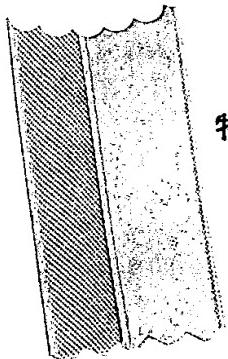
出願人
Applicant(s):

科学技術振興事業団
新井 賢一
正井 久雄

PRIORITY
DOCUMENT

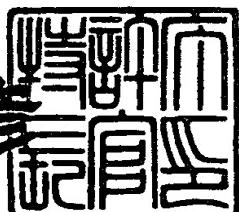
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 1月 7日



特許長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-3091440

【書類名】 特許願
 【整理番号】 NP98282-YS
 【提出日】 平成10年10月30日
 【あて先】 特許庁長官 殿
 【国際特許分類】 C07K 13/00
 【発明の名称】 ヒトH3.7タンパク質と、このタンパク質をコードする
 cDNA

【請求項の数】 17

【発明者】

【住所又は居所】 東京都目黒区目黒1-9-6-206

【氏名】 新井 賢一

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区三田5-7-8 シヤ
 ンボール三田620号

【氏名】 正井 久雄

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都目黒区目黒1-9-6-206

【氏名又は名称】 新井 賢一

【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都港区三田5-7-8 シヤ
 ンボール三田620号

【氏名又は名称】 正井 久雄

【代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒトH37タンパク質と、
このタンパク質をコードするcDNA

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1のアミノ酸配列を有するヒトH37タンパク質。

【請求項2】 配列番号1のアミノ酸配列における1もしくは複数のアミノ酸残基が、欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するヒトH37タンパク質。

【請求項3】 配列番号2のアミノ酸配列を有するヒトH37タンパク質。

【請求項4】 配列番号2のアミノ酸配列における1もしくは複数のアミノ酸残基が、欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するヒトH37タンパク質。

【請求項5】 請求項1または2のヒトH37タンパク質をコードするヒト遺伝子。

【請求項6】 請求項5のヒト遺伝子のcDNAであって、配列番号3の塩基配列を有するcDNA、または配列番号3の塩基配列における1もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を有するcDNA。

【請求項7】 請求項5のヒト遺伝子のcDNAであって、配列番号4の塩基配列を有するcDNA、または配列番号4の塩基配列における1もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を有するcDNA。

【請求項8】 請求項6のcDNAの一部配列からなるDNA断片。

【請求項9】 請求項7のcDNAの一部配列からなるDNA断片。

【請求項10】 請求項6のcDNAを保有する組み換えベクター。

【請求項11】 請求項7のcDNAを保有する組み換えベクター。

【請求項12】 請求項1または2のヒトH37タンパク質に対する抗体。

【請求項13】 請求項3または4のヒトH37タンパク質に対する抗体。

【請求項14】 請求項6のcDNAまたは請求項8のDNA断片を発現制御配列とともに細胞内に導入することを特徴とする細胞の増殖促進方法。

【請求項15】 請求項7のcDNAまたは請求項9のDNA断片を発現制

御配列とともに細胞内に導入することを特徴とする細胞の増殖制御方法。

【請求項16】 請求項10の抗体を細胞内に導入することを特徴とする細胞の増殖抑制方法。

【請求項17】 請求項11の抗体を細胞内に導入することを特徴とする細胞の増殖抑制方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願は、ヒトH37タンパク質と、このタンパク質をコードするcDNAに関するものである。さらに詳しくは、この出願は、ヒト細胞の複製を制御するタンパク質Cdc7の活性制御サブユニットであるヒトH37タンパク質と、このタンパク質をコードするヒト遺伝子およびそのcDNA、H37タンパク質に対する抗体、並びにこれらの遺伝子工学材料や抗体を用いてヒト細胞の増殖を制御する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

細胞の増殖は、増殖因子と呼ばれる液性因子が細胞表面の受容体に結合し、細胞内に増殖にシグナルが伝達されることによって開始される。従って、培養細胞の増殖を人為的に誘導するためには、細胞培地に増殖因子を過剰量添加したり、あるいはその細胞が本来は持っていない受容体を細胞表面に発現させ、その受容体に特異的な因子を培地に添加する方法等がとられてきた。また、細胞増殖を抑制するためには、受容体タンパク質に対する抗体や拮抗分子等を培地に添加し、受容体への増殖因子の結合を阻害する方法等が採用してきた。

【0003】

一方、受容体への増殖因子の結合によって増殖シグナルが発せられた細胞は、そのゲノムDNAを複製し、娘細胞に均等に配分したのち分裂するというサイクルを繰り返す。このサイクルを、特に真核生物については「細胞周期」という。細胞周期は基本的に4期間に区分されている。すなわち、染色体DNAが複製するS期、複製した染色体が紡錘体によって分裂したのち細胞質が分裂するM期、

M期が終わり S期が始まるまでのG1期、そして S期が完了してM期が始まるまでのG2期である。特にG1期からS期への移行は厳密に制御されており、DNA複製は S期において1回だけ生じるようになっている。

【0004】

このような細胞周期は、酵母や高等真核細胞での研究からサイクリン依存性キナーゼがその進行に重要な役割を果たしていることが証明されている (Nature 292:558-560, 1981; Cell 66:731-742, 1991; Nature 349:338-393, 1991; Science 257:1958-1961, 1992; Bioessays 17:471, 1995)。また、酵母における遺伝学的解析からは、S期の開始時 (G1-S移行) には別のセリン／スレオニンキナーゼが重要な役割を果たしていることが明らかになっている。すなわち、細胞分裂周期変異株の一つとして単離されたcdc7変異 (J. Mol. Biol. 59:183-194, 1971)において、Cdc7タンパク質キナーゼは染色体DNAの複製の開始直前に機能すること、そして S期を通じて各複製起点の活性化に必要とされていることが明らかになってきた (Mol. Cell. Biol. 6:1590-1598, 1986; Genes Dev. 15:480-490, 1998; Genes Dev. 15:491-501, 1998)。また、Cdc7のキナーゼ活性は制御サブユニットであるDbf4の存在に依存することも明らかにされている (Genetics 131:21-29, 1992; Mol. Cell. Biol. 13:2899-2908, 1993)。Dbf4の発現は周期的であって、転写レベルおよび翻訳後レベルの両方で制御されており (Exp. Cell Res. 180:419-428, 1989)、G1-S境界期におけるCdc7キナーゼ活性の増加の少なくとも一部はDbf4の発現がG1後期に増加することによって説明されている (Mol. Cell. Biol. 13:2899-2908, 1993; Exp. Cell Res. 180:419-428, 1989)。さらに、Dbf4は細胞内で複製起点と相互に作用する (Science 265:1243-1246, 1994) ことから、Cdc7は複製起点上に形成される複製装置を直接的に活性化することにより S期開始の引き金になっていると考えられている。

【0005】

そしてさらに、この出願の発明者らは、これまでに酵母Cdc7に類似したキナーゼを分裂酵母、アフリカツメガエル、マウスおよびヒトから単離し、真核細胞の染色体複製は種差を超えて共通に保存されたこのキナーゼファミリーを含む機

構によって制御されていることを指摘している (J. Biol. Chem. 273:23248-23257, 1998; EMBO J. 16:4340-4351, 1997; EMBO J. 14:3094-3104, 1995)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

以上のとおりの酵母および高等真核生物における知見から、細胞内のCdc7キナーゼ活性をコントロールすることによって、増殖因子／受容体結合の操作による従来方法とは全く別の手続による細胞増殖の人為的制御が可能になるものと期待される。

【0007】

しかしながら、この出願の発明者らはまた、ヒトのCdc7ホモログの候補であるhuCdc7を動物細胞で増産させても、あるいは昆虫細胞で発現させてもそれ単独ではほとんどキナーゼ活性を示さないことを見出している。

そこで、ヒトCdc7の制御サブユニットの存在を想定し、ヒトcDNAライブラリーを探索した結果、huCdc7に結合してそのキナーゼ活性を制御する新規なタンパク質をコードするcDNAを単離することに成功し、このcDNAにコードされたタンパク質をH37タンパク質と命名した。

【0008】

この出願の発明は、発明者らによって取得されたこの新規タンパク質H37を産業上利用可能な形態として提供することを課題としている。

またこの出願は、このタンパク質をコードするヒト遺伝子、この遺伝子のcDNAおよびタンパク質に対する抗体等の遺伝子操作材料を提供することを課題としている。

【0009】

さらにこの出願は、これらの遺伝子操作材料を用いてヒト細胞の増殖を人の制御する方法を提供することを課題としてもいる。

【0010】

【課題を解決するための手段】

この出願は、上記の課題を解決する発明として、配列番号1または2のアミノ酸配列を有するヒトH37タンパク質を提供する。

また、この出願は、配列番号1または2のアミノ酸配列における1もしくは複数のアミノ酸残基が、欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するヒトH37タンパク質を提供する。

【0011】

さらに、この出願は、上記のヒトH37タンパク質をコードするヒト遺伝子、このヒト遺伝子のcDNAであって、配列番号3または4の塩基配列を有するcDNA、およびこれらcDNAの一部配列からなるDNA断片を提供する。

さらにまたこの出願は、上記cDNAを保有する組換えベクター、およびヒトH37タンパク質に対する抗体を提供する。

【0012】

そしてまたこの出願は、前記cDNAまたはその部分的あるいは一部を改変し変異を導入したDNA断片を発現制御配列とともに細胞内に導入することを特徴とする細胞の増殖促進方法、ならびに前記抗体を細胞内に導入することを特徴とする細胞の増殖抑制方法を提供する。

以下、この発明の実施の形態について詳しく説明する。

【0013】

【発明の実施の形態】

この発明のヒトH37タンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列を有し、配列番号3に塩基配列を示したcDNAの518から2541番目までの配列領域にコードされているタンパク質分子である。この発明のH37タンパク質はまた、配列番号2のアミノ酸配列を有し、配列番号4のcDNAにおける518から1222番目までの配列領域にコードされているタンパク質である。配列番号3および4は同一のゲノム遺伝子から転写されたmRNAを雛型とするcDNAであるが、配列番号4のcDNAは、配列番号3とは別のスプライシングフォームであり、配列番号3の1199-1259番目までが欠失している。

【0014】

これらのH37タンパク質は公知の方法、すなわちヒトの臓器、細胞株などから単離する方法、この発明によって提供されるアミノ酸配列に基づき化学合成によってペプチドを調製する方法、あるいはこの発明によって提供されるcDNA

断片を用いて組換えDNA技術で生産する方法などにより取得することができる。例えば、組換えDNA技術によってH37タンパク質を取得する場合には、この発明のcDNA断片を有するベクターからインビトロ転写によってRNAを調製し、これを鑄型としてインビトロ翻訳を行なうことによりインビトロで発現できる。また翻訳領域を公知の方法により適当な発現ベクターに組換えてやれば、大腸菌、枯草菌、酵母、動物細胞等で、cDNAがコードするH37タンパク質を大量に発現させることができる。

【0015】

この発明のヒトH37タンパク質を大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、cDNAクローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに、この発明のcDNAの翻訳領域を挿入結合して組換えた発現ベクターを作成し、この発現ベクターで宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体を培養してやれば、cDNAがコードしているH37タンパク質を微生物内で大量生産することができる。あるいは、他の蛋白質との融合蛋白質として発現させることもできる。得られた融合蛋白質を適当なプロテアーゼで切断することによって、cDNAがコードするタンパク質部分のみを取得することもできる。

【0016】

この発明のヒトH37タンパク質を動物細胞で発現させる場合には、この発明のcDNAの翻訳領域を、動物細胞用プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する動物細胞用発現ベクターに組換え、動物細胞内に導入してやれば、この発明のH37タンパク質を動物細胞内で発現できる。

以上のとおりの方法によって得られるヒトH37タンパク質は、例えば、細胞内のhuCdc7のキナーゼ活性を阻害することによって細胞の増殖を抑制するための抗体作成のための抗原として使用することができる。

【0017】

また、この発明のヒトH37タンパク質は、後記する実施例において実証されているように、構造上はこれまでに明らかにされているサイクリンとはほとんど類似性を持たないが、その発現が細胞周期によって制御されること、またhuCdc

7触媒サブユニットに結合してそのキナーゼ活性を活性化するという点で、huCdc7キナーゼのサイクリン様構成因子とみなすことができる。従って、H37タンパク質は増殖因子によって誘導される細胞増殖のためのシグナル伝達経路において非常に重要な標的因子と考えられることから、H37タンパク質の発現あるいはその活性がG1-S期の細胞周期のシグナルによってどのように制御されているかを明らかにすることが、動物細胞における細胞複製の細胞周期制御の分子機構を明らかにする上で大きな新しい知見を提供するものと期待される。

【0018】

この発明のヒトH37タンパク質には、配列番号1または2で表されるアミノ酸配列のいかなる部分アミノ酸配列を含むペプチド断片（5アミノ酸残基以上）も含まれる。これらのペプチド断片もまた抗体を作製するための抗原として用いることができる。

この発明の遺伝子は、上記ヒトH37タンパク質をコードするヒトの遺伝子であって、例えば、この発明のcDNAまたはその一部配列をプローブとして、既存のゲノムライブラリーから単離することができる。

【0019】

この発明のcDNAは、配列番号3または4で表される塩基配列を有することを特徴とするものであり、例えばヒト細胞由来cDNAライブラリーからクローニングすることができる。cDNAはヒト細胞から抽出したポリ(A)⁺RNAを鑄型として合成する。ヒト細胞としては、人体から手術などによって摘出されたものでも培養細胞でも良い。cDNAは、岡山-Berg法(Okayama, H. and Berg, P., Mol. Cell. Biol., 2:161-170, 1982)、Gubler-Hoffman法(Gubler, U. and Hoffman. J. Gene, 25:263-269, 1983)、キャッピング法(Kato, S. et al., Gene, 150:243-250, 1994)などの公知の方法を用いて作製することができる。

【0020】

この発明のヒトH37タンパク質は脳および腎臓以外のいかなる組織でも発現しているので、配列番号3または4に記載のcDNAの塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドプローブを用いて、ヒト細胞から作製したヒトcDNA

ライブラリーをスクリーニングすることにより、この発明のcDNAと同一のクローンを容易に得ることができる。あるいは、これらのオリゴヌクレオチドをプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を用いて、目的cDNAを合成することもできる。

【0021】

一般にヒト遺伝子は個体差による多型が頻繁に認められる。従って配列番号3または4において、1または複数個のヌクレオチドの付加、欠失および／または他のヌクレオチドによる置換がなされているcDNAもこの発明に含まれる。

同様に、これらの変更によって生じる1または複数個のアミノ酸残基の付加、欠失および／または他のアミノ酸残基による置換がなされているタンパク質も、配列番号1または2で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質の活性を有する限り、この発明に含まれる。また、人為的に1または複数個のアミノ酸残基の付加、欠失および／または他のアミノ酸残基による置換を導入した変異タンパク質もこの発明に含まれる。

【0022】

この発明のDNA断片には、配列番号3または4で表される塩基配列のいかなる部分塩基配列を含むcDNA断片（10bp以上）、あるいはそれらのアンチセンス鎖からなるDNA断片も含まれる。

この発明のヒトH37タンパク質に対する抗体は、タンパク質それ自体、またはその部分ペプチドを抗原として、公知の方法により、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体として得ることができる。

【0023】

この発明の細胞増殖促進方法は、配列番号3または4の塩基配列を有するcDNA、もしくはそれらの一部配列からなるDNA断片（例えば後記実施例3に示したように、C端側の419個のアミノ酸配列領域をコードするDNA断片）とその発現制御配列（動物細胞用プロモーターおよび／またはエンハンサー配列）からなる組換えDNAを動物細胞に導入し、配列番号1または2のアミノ酸配列を有するH37タンパク質を細胞核内で過剰発現させることによって行うことができる。組換えDNAの細胞内への導入は公知の方法により行うことができる。例

えばリン酸カルシウム法、リポソームや赤血球ゴーストを用いる方法、エレクトロポレーション法、レトロウイルスやアデノウイルスをベクターとして用いる方法、ガラスピペットによる微量注入法等である。このような細胞増殖の促進は、例えば、ヒト疾患の治療に有用な幹細胞を大量に取得するために有用である。すなわち、血液幹細胞や神経幹細胞など、他種類の細胞に分化する幹細胞は、ヒトの身体を構成する多くのタンパク質を作り出すことができるため、白血病等の疾患において幹細胞の移植は極めて重要な治療手段である。しかしながら、幹細胞を分化させることなしに自己増殖させる液性因子は同定されていないため、治療に必要な量の幹細胞を調製することは容易ではなかった。この発明の方法は、幹細胞内の増殖プログラムを操作することによって試験管内で無制限に細胞を自己複製、自己増殖させることを可能にする。また、このような試験内での細胞増殖促進は、*ex vivo* 方式による遺伝子治療のための遺伝子導入用細胞を大量に調製するためにも有用である。

【0024】

この発明の細胞増殖抑制方法は、前記の抗体を細胞内に注入することによって行うことができる。あるいは、細胞内在性のH3.7タンパク質遺伝子の発現を阻害することによっても行うことができる。例えば、遺伝子の転写産物に対するアンチセンス配列またはリボザイム配列をコードするDNAを細胞内に導入する方法等である。このような細胞増殖の抑制は、例えば癌細胞の過剰増殖を抑制するための新たな手段を提供するものと期待される。

【0025】

【実施例】

次に実施例を示し、この発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明はこれらの例に限定されるものではない。

実施例1：

HeLa細胞のcDNAライブラリーをpGAD-GHベクターを用いて作成し、huCdc7がGal4のDNA結合ドメインに融合された組換えプラスミドを保有する酵母CG1945株に各ベクターを導入した。約 3×10^5 個の形質転換体酵母をスクリーニングした結果、ベータガラクトシダーゼが陽性のクローンを5個

得た。インサートのDNA塩基配列を決定し、データベースを検索した結果、これらは全て新しいcDNAであった。そのうち3クローンは同一のものであり、配列番号1の塩基配列を有していた。このcDNAをH37と命名した。他の2つは単独のクローンであり、それぞれH1およびH18と命名した。

【0026】

これらの陽性クローンによるコードされるタンパク質とhuCdc7との相互作用を動物細胞における増産系を用いてさらに検討した。すなわち、mycエピトープで標識したH1、H18およびH37のそれぞれの発現プラスミドを全長huCdc7発現プラスミドとともに動物細胞Cos7にトランスフェクションした。結果は図1に示したとおりである。huCdc7に対する抗体による免疫沈降によってH37タンパク質は共沈殿されたが、H1およびH18タンパク質は共沈殿されなかった（図1：上段レーン2-4）。逆に、myc抗体を用いた免疫沈降により、huCdc7はmyc標識のH37を共発現している細胞においてのみ共沈殿された（図1：下段レーン4）。この結果から、H37cDNAのみがhuCdc7と効率よく相互作用するタンパク質をコードしていることが確認された。

【0027】

次いで、内在性のH37タンパク質について調べるために、H37のN端およびC端領域に対する抗体（抗H37N抗体、抗H37C抗体）をそれぞれ作成した。さらに、H37のC端オリゴペプチドに対する抗体（抗H37C_{pep}抗体）およびhuCdc7のC端オリゴペプチドに対する抗体（抗huCdc7C_{pep}抗体）も作成した。そして、各抗体と細胞内における内在性huCdc7およびH37との会合を測定した。結果は図2に示したとおりである。すなわち、H37に対する抗体はいずれもCos細胞で発現した90kDaのmyc標識H37タンパク質と特異的に反応した（図2：レーン1-4）。アフィニティ精製した抗ペプチド抗体を用いてヒトCEM細胞から調製した複合体を共沈殿することができた。huCdc7およびH37免疫沈殿物中にいずれもhuCdc7が含まれていることが抗huCdc7C_{pep}抗体を用いた免疫プロットにより確認された（図2：レーン5および7）。このH37とhuCdc7との相互作用は、抗体作成の抗原として用いたペプチドと抗体とを予めpre-incubationすることによって完全に消失した（図2：レーン8）

。HeLa細胞の抽出液においては、Cdc7抗体およびH37抗体はいずれも、H37抗体と特異的に反応する80kDaの1本のポリペプチドを共沈殿することができた(図2:レーン9-13)。

【0028】

以上の結果から、内在性のhuCdc7とH37タンパク質が複合体として細胞内に存在していることが判明した。

実施例2

H37タンパク質がhuCdc7を活性化する能力があるか否かを調べるために、myc標識したH37と野生型あるいはキナーゼ失活型のhuCdc7をCos細胞で発現させて得たhuCdc7/H37キナーゼ複合体を、huCdc7抗体またはmyc抗体で免疫沈殿し、続いてGST-MCM3融合タンパク質を基質として用いて、in vitroのキナーゼ反応を測定した。結果は図3および図4に示したとおりである。野生型のhuCdc7の存在下では、huCdc7抗体の免疫沈降物およびmyc抗体の免疫沈降物の両方においてMCM3タンパク質の効率のよいリン酸化観察された(図3:レーン2および7)。さらに、もう2本のリン酸化タンパク質が観察され、それらはトランスフェクションされたhuCdc7およびmycH37であると同定された(データ示さず)。これらのリン酸化はキナーゼ失活型のhuCdc7では全く検出されないことから、huCdc7のキナーゼ活性がこれらのリン酸化に作用していることが確認された。ただし、キナーゼ失活型のhuCdc7もH37タンパク質と複合体を形成することができる(図3:レーン3および8、図4:レーン2および4)。さらにタンパクゲル電気泳動上でのH37タンパク質の移動度は野生型huCdc7が共発現されている場合は遅くなり、複数のバンドとして検出されたが、この移動度の変化はキナーゼ失活型huCdc7では観察されなかった(図4:レーン1および3)。移動度が遅くなっているバンドは脱リン酸化酵素処理により消失することから、それらは過リン酸化されたH37タンパク質であることが確認された(データ示さず)。また、昆虫細胞においてhuCdc7とH37タンパク質を共発現することにより、MCM2およびMCM3タンパク質を効率よくリン酸化することのできる極めて強いキナーゼ活性を再構成することができた(データ示さず)。

【0029】

以上の結果は、H37タンパク質がhuCdc7キナーゼを活性化し、さらにH37タンパク質自身がhuCdc7によりリン酸化されることを示している。

また、これらの実験条件下では、huCdc7触媒サブユニットのみが発現された場合には、内在性のH37タンパク質のレベルが低すぎるためにキナーゼ活性は僅かであった（図3：レーン4および9）。これらの事実から、H37タンパク質がhuCdc7の制御細胞ユニットをコードし、そのキナーゼ活性を特異的に活性化していることが確認された。

実施例3

H37タンパク質のアミノ酸配列（配列番号1）を検討した。その結果、図5および図6に示したように、出芽酵母Dbf4と33%の相同性を有するアミノ酸配列領域が見出された。この保存ドメイン（H37モチーフC）は、ラット、ショウジョウバエおよび分裂酵母で同定されたH37類似遺伝子にも存在する（図6）。また、H37のもう一つのアミノ酸領域（H37モチーフN）はラットおよびショウジョウバエのH37類似遺伝子に保存されていた。ただし、このH37モチーフNは出芽酵母のDbf4タンパク質には保存されていなかった（図6）。

【0030】

次に、huCdc7との結合に必須なH37タンパク質上の領域を決定するために、図7に示したような一連のH37N端およびC端欠失変異を作成し、各々をGal4活性化ドメインとの融合タンパク質として酵母内で発現させて、それぞれの欠失変異体とhuCdc7との相互作用をtwo-hybridアッセイで検討した。結果は図8に示したとおりである。N端の欠失の結果、N端255アミノ酸を削除してもhuCdc7との相互作用には影響を与えたなかった（△N2）。しかしながら、さらにN端50アミノ酸を削除してH37モチーフCを欠失させるとhuCdc7との相互作用は完全に失われた（△N3）。

【0031】

一方、C端からの欠失においては、20アミノ酸を削除しただけでhuCdc7との結合能力が約60%まで低下した（△C）。さらに、243あるいは369アミノ

酸をC端から欠失させると (ΔP_2 および ΔB) 、相互作用は全長クローンの約 10%までに低下した。N端の235 アミノ酸のみを含む ΔP_1 は huCdc7 と相互作用しなかった。ただし、 ΔB と ΔN_2 に共通に存在する 50 アミノ酸は huCdc7 との効率のよい相互作用のためには充分ではなかった（データ示さず）。

【0032】

以上に述べた H37 欠失誘導体の一部を huCdc7 とともに COS7 細胞内に共発現し、 huCdc7 タンパク質と複合体を形成するかを抗体共沈法により確認した。その結果、 two-hybrid assay の結果と同様に、全長 H37 タンパク質の他に、 deltaB, deltaN2 の H37 欠失誘導体のみが huCdc7 と複合体を形成することが明らかにされた（図9）。

【0033】

以上の結果は、 H37 モチーフ C が H37 タンパク質と huCdc7 触媒サブユニットとの相互作用に必須であること、しかしそれのみでは充分ではないことを示している。出芽酵母においては、 H37 モチーフ C を含む領域が Cdc7 との結合に充分であるということが既に報告されている（Mol. Cell. Biol. 15:6775-6782, 1996）。さらに、これらの欠失変異を用いて in vitro キナーゼ反応を行った結果、 Dbf4 モチーフ C を含む C 端の 419 アミノ酸のみでリン酸化活性で充分であることが判明した（データ示さず）。

実施例4

種々のヒト組織および癌細胞における H37 mRNA の発現パターンをノーザンプロットにより検討した。結果は図10 a, b に示したとおりである。H37 cDNA 特異的プローブにより、脳と腎臓以外の全ての組織において、また全ての癌細胞において、 2.5 kb の転写産物が検出された。このことは、 huCdc7 の mRNA は脳と腎臓においても比較的高い発現が観察されること（EMBO J. 16:4340-4351, 1997）とは対照的であった。検査した組織の中では、 H37 mRNA の発現が最も高かったのは睾丸、次いで胸腺であり、この両組織は huCdc7 触媒サブユニットの発現が特に高い組織でもあることが発明者等によって報告されている（EMBO J. 16:4340-4351, 1997）。また、睾丸においては 6 kb と 4 kb の 2 本の別の RNA バンドも検出された（図10 a）が、これらの転写産物の正体は不

明である。さらに、H37mRNAは、肺癌細胞A549を除いたほとんど全ての癌細胞において極めて高いレベルで発現していることが確認された（図10b）。このことは、活発な増殖能を有する細胞でもH37タンパク質の重要な役割を示している。

実施例5

H37の発現が細胞周期によって制御されているかどうかを検討するため、ヒト正常線維芽細胞WI38細胞を血清飢餓によりG0期に同調させ（図11）、トータルRNAを血清添加後の種々の時間に調整し、ノーザンプロットでH37mRNAのレベルを検討した。結果は図12に示したとおりである。H37mRNAレベルは、休止期の細胞では低く、細胞がG1-S境界に近づくに従って徐々に増加していき、血清添加後20時間で最大に達した。この図12に示した発現パターンは、増殖刺激によって誘導されることが知られているhuCdc6の転写産物の発現パターン（Mol. Cell. Biol. 15:4215-4224, 1995; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:142-147, 1997）に似ている。

【0034】

さらに、H37の細胞周期内で発現変動を調べるために、エルトリエーション法によりヒトCEM細胞を各細胞周期に分画し（図13）、ノーザンプロットを行った（図14）。その結果、H37mRNAはG1期には低く、G1後期からS期にかけて上昇し、S期の間は高く維持され、G2期にやや減少するがまだ高く維持されていることが示された。また、ノコダゾールによりHeLa細胞をG2後期に停止させ、同調的に細胞周期を移行させた実験（図15）においてもH37mRNAはG2からG1への移行に従って減少し、S期への移行の際に再び上昇することが示された（図16）。Cdc6の発現も同様にG1からS期への移行に伴って上昇するが、S期が進行するにつれて減少し、G2期には低く抑えられる点がH37とは異なる。この結果は、H37mRNAの発現は進行する細胞周期のなかでも変動し、それが機能すると考えられるS期に最大になることを示す。

【0035】

H37の発現をさらに調べるために動物細胞内におけるH37タンパク質の細胞内局在を測定した。2種類のH37特異的抗体を用いて間接蛍光抗体法を行っ

た結果、HeLa細胞とWI38細胞の両方において、内在性H37タンパク質は核内に非常に明確な数々のスポットとして観察された（図17）。

これらの結果および発明者らがすでに報告しているhuCDC7触媒サブユニットの核内局在（EMBO J. 16:4340-4351, 1997）とあわせて、huCDC7/H37複合体は核に局在するキナーゼであり、その制御細胞ユニットは細胞周期のシグナルに依存して発現していることが確認された。

実施例6

細胞周期のG1-S移行における内在性H37タンパク質の機能を抗体微量注入法により検討した。H37タンパク質のN端305アミノ酸に対する抗体（抗H37N抗体）およびC端のオリゴペプチドに対する抗体（抗H37Cpep抗体）をアフィニティ精製し、これらの抗体をヒト唇由来の正常線維芽細胞（KD細胞）に微量注入した。KD細胞は予め血清飢餓によってG0期に停止させておき、血清再添加によって同調的に細胞周期へと進行させたものを使用した。ヌクレオチド誘導体であって、細胞内に取り込まれるBrdU陽性の細胞数を測定することにより、どれくらいの画分の細胞が決定添加後の種々の時期にS期に存在するかを調べた。結果は図18に示したとおりである。細胞は血清添加後約18時間でDNA合成を始め、24時間後にはほぼ90%の細胞がS期に入っていることを確認した。

【0036】

従って、この実施例では、細胞がまだG1後期の状態である血清添加後12時間の時点で抗体を微注入し、ほぼ完全にS期に入ったと考えられる26時間後の時点で細胞を固定してBrdU陽性細胞を計測した。結果は図19に示したとおりである。抗H37N抗体を微注入した細胞の70%がS期に移行することができなかったのに対し、コントロール抗体による影響はほとんど見られなかった。また、抗H37Cpep抗体の微注入によっても抗H37N抗体と同等あるいはそれ以上のS期移行阻害効果が観察された。しかも、抗H37Cpep抗体作成のための抗原であるペプチドと抗H37Cpep抗体とを同時に細胞内に微注入した場合には、70%以上の細胞がS期に移行することができた。

【0037】

図20は、BrdUと微注入抗体の染色例である。抗体は細胞がG1中期から後期にある段階で微注入されており、この時期にはH37タンパク質の発現は低いと考えられる。微注入された抗体は、新しく合成されたH37タンパク質に効率よく結合し、その結果、H37タンパク質の核内への移行を阻害すると考えられる。これらの結果は、H37の機能、すなわちhuCdc7/H37複合体の機能が動物細胞のS期進行に要求されることを強く示唆する。

【0038】

【発明の効果】

以上詳しく述べたとおり、この発明によって、ヒト細胞の複製を制御するタンパク質Cdc7の活性制御サブユニットであるヒトH37タンパク質と、このタンパク質をコードするヒト遺伝子およびそのcDNA、H37タンパク質に対する抗体、並びにこれらの遺伝子工学材料や抗体を用いてヒト細胞の増殖を制御する方法が提供される。これによって、各種のヒト疾患の治療に用いられる幹細胞等の必要量を調整することが可能となり、あるいは癌細胞の増殖抑制のための新規な手段を開発することが可能となる。

【0039】

【配列表】

<110> 出願人氏名：科学技術振興事業団

<120> 発明の名称：ヒトH37タンパク質と、このタンパク質をコードする
cDNA

<160> 配列の総数：4

<210> 配列番号：1

<211> 配列の長さ：674

<212> 配列の型：PRT

<213> ホモーサピエンス

<400> 配列

Met Asn Ser Gly Ala Met Arg Ile His Ser Lys Gly His Phe Gln Gly

1 5 10 15

Gly Ile Gln Val Lys Asn Glu Lys Asn Arg Pro Ser Leu Lys Ser Leu

20	25	30
Lys Thr Asp Asn Arg Pro Glu Lys Ser Lys Cys Lys Pro Leu Trp Gly		
35	40	45
Lys Val Phe Tyr Leu Asp Leu Pro Ser Val Thr Ile Ser Glu Lys Leu		
50	55	60
Gln Lys Asp Ile Lys Asp Leu Gly Gly Arg Val Glu Glu Phe Leu Ser		
65	70	75
Lys Asp Ile Ser Tyr Leu Ile Ser Asn Lys Lys Glu Ala Lys Phe Ala		
85	90	95
Gln Thr Leu Gly Arg Ile Ser Pro Val Pro Ser Pro Glu Ser Ala Tyr		
100	105	110
Thr Ala Glu Thr Thr Ser Pro His Pro Ser His Asp Gly Ser Ser Phe		
115	120	125
Lys Ser Pro Asp Thr Val Cys Leu Ser Arg Gly Lys Leu Leu Val Glu		
130	135	140
Lys Ala Ile Lys Asp His Asp Phe Ile Pro Ser Asn Ser Ile Leu Ser		
145	150	155
Asn Ala Leu Ser Trp Gly Val Lys Ile Leu His Ile Asp Asp Ile Arg		
165	170	175
Tyr Tyr Ile Glu Gln Lys Lys Glu Leu Tyr Leu Leu Lys Lys Ser		
180	185	190
Ser Thr Ser Val Arg Asp Gly Gly Lys Arg Val Gly Ser Gly Ala Gln		
195	200	205
Lys Thr Arg Thr Gly Arg Leu Lys Lys Pro Phe Val Lys Val Glu Asp		
210	215	220
Met Ser Gln Leu Tyr Arg Pro Phe Tyr Leu Gln Leu Thr Asn Met Pro		
225	230	235
Phe Ile Asn Tyr Ser Ile Gln Lys Pro Cys Ser Pro Phe Asp Val Asp		
245	250	255

Lys Pro Ser Ser Met Gln Lys Gln Thr Gln Val Lys Leu Arg Ile Gln
 260 265 270
 Thr Asp Gly Asp Lys Tyr Gly Gly Thr Ser Ile Gln Leu Gln Leu Lys
 275 280 285
 Glu Lys Lys Lys Lys Gly Tyr Cys Glu Cys Cys Leu Gln Lys Tyr Glu
 290 295 300
 Asp Leu Glu Thr His Leu Leu Ser Glu Gln His Arg Asn Phe Ala Gln
 305 310 315 320
 Ser Asn Gln Tyr Gln Val Val Asp Asp Ile Val Ser Lys Leu Val Phe
 325 330 335
 Asp Phe Val Glu Tyr Glu Lys Asp Thr Pro Lys Lys Lys Arg Ile Lys
 340 345 350
 Tyr Ser Val Gly Ser Leu Ser Pro Val Ser Ala Ser Val Leu Lys Lys
 355 360 365
 Thr Glu Gln Lys Glu Lys Val Glu Leu Gln His Ile Ser Gln Lys Asp
 370 375 380
 Cys Gln Glu Asp Asp Thr Thr Val Lys Glu Gln Asn Phe Leu Tyr Lys
 385 390 395 400
 Glu Thr Gln Glu Thr Glu Lys Lys Leu Leu Phe Ile Ser Glu Pro Ile
 405 410 415
 Pro His Pro Ser Asn Glu Leu Arg Gly Leu Asn Glu Lys Met Ser Asn
 420 425 430
 Lys Cys Ser Met Leu Ser Thr Ala Glu Asp Asp Ile Arg Gln Asn Phe
 435 440 445
 Thr Gln Leu Pro Leu His Lys Asn Lys Gln Glu Cys Ile Leu Asp Ile
 450 455 460
 Ser Glu His Thr Leu Ser Glu Asn Asp Leu Glu Glu Leu Arg Val Asp
 465 470 475 480
 His Tyr Lys Cys Asn Ile Gln Ala Ser Val His Val Ser Asp Phe Ser

485

490

495

Thr Asp Asn Ser Gly Ser Gln Pro Lys Gln Lys Ser Asp Thr Val Leu

500

505

510

Phe Pro Ala Lys Asp Leu Lys Glu Lys Asp Leu His Ser Ile Phe Thr

515

520

525

His Asp Ser Gly Leu Ile Thr Ile Asn Ser Ser Gln Glu His Leu Thr

530

535

540

Val Gln Ala Lys Ala Pro Phe His Thr Pro Pro Glu Glu Pro Asn Glu

545

550

555

560

Cys Asp Phe Lys Asn Met Asp Ser Leu Pro Ser Gly Lys Ile His Arg

565

570

575

Lys Val Lys Ile Ile Leu Gly Arg Asn Arg Lys Glu Asn Leu Glu Pro

580

585

590

Asn Ala Glu Phe Asp Lys Arg Thr Glu Phe Ile Thr Gln Glu Glu Asn

595

600

605

Arg Ile Cys Ser Ser Pro Val Gln Ser Leu Leu Asp Leu Phe Gln Thr

610

615

620

Ser Glu Glu Lys Ser Glu Phe Leu Gly Phe Thr Ser Tyr Thr Glu Lys

625

630

635

640

Ser Gly Ile Cys Asn Val Leu Asp Ile Trp Glu Glu Asn Ser Asp

645

650

655

Asn Leu Leu Thr Ala Phe Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Thr Phe Thr

660

665

670

Gly Phe

674

<210> 配列番号 : 2

<211> 配列の長さ : 234

<212> 配列の型 : P R T

<213> ホモーサピエンス

<400> 配列

Met Asn Ser Gly Ala Met Arg Ile His Ser Lys Gly His Phe Gln Gly
 1 5 10 15
 Gly Ile Gln Val Lys Asn Glu Lys Asn Arg Pro Ser Leu Lys Ser Leu
 20 25 30
 Lys Thr Asp Asn Arg Pro Glu Lys Ser Lys Cys Lys Pro Leu Trp Gly
 35 40 45
 Lys Val Phe Tyr Leu Asp Leu Pro Ser Val Thr Ile Ser Glu Lys Leu
 50 55 60
 Gln Lys Asp Ile Lys Asp Leu Gly Gly Arg Val Glu Glu Phe Leu Ser
 65 70 75 80
 Lys Asp Ile Ser Tyr Leu Ile Ser Asn Lys Lys Glu Ala Lys Phe Ala
 85 90 95
 Gln Thr Leu Gly Arg Ile Ser Pro Val Pro Ser Pro Glu Ser Ala Tyr
 100 105 110
 Thr Ala Glu Thr Thr Ser Pro His Pro Ser His Asp Gly Ser Ser Phe
 115 120 125
 Lys Ser Pro Asp Thr Val Cys Leu Ser Arg Gly Lys Leu Leu Val Glu
 130 135 140
 Lys Ala Ile Lys Asp His Asp Phe Ile Pro Ser Asn Ser Ile Leu Ser
 145 150 155 160
 Asn Ala Leu Ser Trp Gly Val Lys Ile Leu His Ile Asp Asp Ile Arg
 165 170 175
 Tyr Tyr Ile Glu Gln Lys Lys Glu Leu Tyr Leu Leu Lys Ser
 180 185 190
 Ser Thr Ser Val Arg Asp Gly Gly Lys Arg Val Gly Ser Gly Ala Gln
 195 200 205
 Lys Thr Arg Thr Gly Arg Leu Lys Lys Pro Phe Val Lys Val Glu Asp
 210 215 220

Met Ser Gln Ser Pro Ala Val His Leu Met

225 230 234

<210> 配列番号 : 3

<211> 配列の長さ : 2780

<212> 配列の型 : DNA

<213> ホモーサピエンス

<400> 配列

AATTGGCAC	GAGCTCTCTG	AGGCTGCGCC	AAGACCTGAA	GCGGCGGACC	GAGAGCCGG	60
GTCTGAGACT	GAGAGAGCAA	CGGAATGGAG	GCGGGGTAGA	GGCGGAAACA	CAACCTGCAG	120
GGCCAGAGCG	AGGCCGAGA	AGGACGGCGG	CGTGAGGGGG	CGGGGCGCGC	AGCGCGAGAA	180
GGCAGGCACG	AGGGCGAGC	GCGAGGCAGG	GCACGGCGCG	TGGCGTGAGA	CGGGGCGGGG	240
CGCGCGTATC	GGCGCCGCGG	CCGCGTGACG	CGTTTCAAAA	TCTTCAACCG	CCGCAGCCCA	300
CTCGTTCTG	CTTGCGCCT	TCCTCCTCCG	CGCCTGGAG	CCGGATCCGG	CCCCGGAAAC	360
CCGACCTGCA	GACGCGGTAC	CTCTACTGCG	TAGAGGCCGT	AGCTGGCGGA	AGGAGAGAGG	420
CGGCCGTCT	GTCAACAGGC	CGGGGGAAGC	CGTGCTTTCG	CGGCTGCCCG	GTGCGACACT	480
TTCTCCGGAC	CCAGCATGTA	GGTGCCGGGC	GACTGCCATG	AACTCCGGAG	CCATGAGGAT	540
CCACAGTAAA	GGACATTCC	AGGGTGGAAAT	CCAAGTCAAA	AATGAAAAAA	ACAGACCATC	600
TCTGAAATCT	CTGAAAATG	ATAACAGGCC	AGAAAAATCC	AAATGTAAGC	CACTTTGGGG	660
AAAAGTATTT	TACCTTGACT	TACCTTCTGT	CACCATATCT	AAAAAACTTC	AAAAGGACAT	720
TAAGGATCTG	GGAGGGCGAG	TTGAAGAATT	TCTCAGCAAA	GATATCAGTT	ATCTTATTTC	780
AAATAAGAAG	GAAGCTAAAT	TTGCACAAAC	CTTGGGTCGA	ATTCTCCTG	TACCAAGTCC	840
AGAATCTGCA	TATACTGCAG	AAACCACTTC	ACCTCATCCC	AGCCATGATG	GAAGTTCATT	900
TAAGTCACCA	GACACAGTGT	GTTTAAGCAG	AGGAAAATTA	TTAGTTGAAA	AAGCTATCAA	960
GGACCATGAT	TTTATTCCCTT	CAAATAGTAT	ATTATCAAAT	GCCTTGTAT	GGGGAGTAAA	1020
AATTCTTCAT	ATTGATGACA	TTAGATACTA	CATTGAACAA	AAGAAAAAAG	AGTTGTATTT	1080
ACTCAAGAAA	TCAAGTACTT	CAGTAAGAGA	TGGGGCAAA	AGAGTTGGTA	GTGGTGCACA	1140
AAAAACAAGA	ACAGGAAGAC	TCAAAAAGCC	TTTGTAAG	GTGGAAGATA	TGAGCCAACT	1200
TTATAGGCCA	TTTATCTTC	AGCTGACCAA	TATGCCCTTT	ATAAATTATT	CTATTCAAGAA	1260
GCCCTGCAGT	CCATTGATG	TAGACAAGCC	ATCTAGTATG	CAAAAGCAAA	CTCAGGTTAA	1320

ACTAAGAAC	CAAACAGATG	GCGATAAGTA	TGGTGGAAACC	TCAATTCAAC	TCCAGTTGAA	1380
AGAGAAGAAG	AAAAAAAGGAT	ATTGTGAATG	TTGCTTGAG	AAATATGAAG	ATCTAGAAAC	1440
TCACCTTCTA	AGTGAGCAAC	ACAGAAAATT	TGCACAGAGT	AACCAGTATC	AAGTTGTTGA	1500
TGATATTGTA	TCTAAGTTAG	TTTTGACTT	TGTGGAATAT	GAAAAGGACA	CACCTAAAAA	1560
GAAAAGAATA	AAATACAGTG	TTGGATCCCT	TTCTCCTGTT	TCTGCAAGTG	TCCTGAAAAA	1620
GAUTGAACAA	AAGGAAAAAG	TGGAATTGCA	ACATATTCT	CAGAAAGATT	GCCAGGAAGA	1680
TGATACAACA	GTGAAGGAGC	AGAATTTCCT	GTATAAAGAG	ACCCAGGAAA	CTGAAAAAAA	1740
GCTCCTGTT	ATTCAGAGC	CCATCCCCA	CCCTTCAAAT	GAATTGAGAG	GGCTTAATGA	1800
GAAAATGAGT	AATAATGTT	CCATGTTAAG	TACAGCTGAA	GATGACATAA	GACAGAATT	1860
TACACAGCTA	CCTCTACATA	AAAACAAACA	GGAATGCATT	CTTGACATT	CCGAACACAC	1920
ATTAAGTGAA	AATGACTTAG	AAGAACTAAG	GGTAGATCAC	TATAAATGTA	ACATACAGGC	1980
ATCTGTACAT	GTTCCTGATT	TCAGTACAGA	TAATAGTGG	TCTCAACCAA	AACAGAAGTC	2040
AGATACTGTG	CTTTTCCAG	CAAAGGATCT	CAAGGAAAAG	GACCTTCATT	CAATATTAC	2100
TCATGATTCT	GGTCTGATAA	CAATAAACAG	TTCACAAGAG	CACCTAACTG	TTCAAGGAAA	2160
GGCTCCATT	CATACTCCTC	CTGAGGAACC	CAATGAATGT	GAATTCAAGA	ATATGGATAG	2220
TTTACCTTCT	GGTAAAATAC	ATCGAAAAGT	GAAAATAATA	TTAGGACGAA	ATAGAAAAGA	2280
AAATCTGGAA	CCAAATGCTG	AATTGATAA	AAGAACTGAA	TTTATTACAC	AAGAAGAAAA	2340
CAGAATTGT	AGTTCACCGG	TACAGTCTT	ACTAGACTTG	TTTCAGACTA	GTGAAGAGAA	2400
ATCAGAATT	TTGGGTTCA	CAAGCTACAC	AGAAAAGAGT	GGTATATGCA	ATGTTT	2460
TATTGAA	GAGGAAAATT	CAGATAATCT	GTTAACAGCG	TTTTCTCGT	CCCCTCAAC	2520
TTCTACATT	ACTGGCTTT	AGAATTAAA	AAATGCATAC	TTTCAGAAG	TGATAAGGAT	2580
CATATTCTG	AAATTTTAT	AAATATGTAT	GGAAATTCTT	AGGATTTTT	TACCAAGCTT	2640
GTTCACAGAC	CCAAATGTAA	ATATTA	AAAATATTG	CAATTTCTA	CAGAATTGAA	2700
TACCTGTTAA	AGAAAAATT	CAGAATAAAC	TTGTGACTGG	TCTTGT	TTA CATTAAAAAA	2760
AAAAAAAAAA	AAAAC	TCGAG				2780

<210> 配列番号：4

<211> 配列の長さ：2719

<212> 配列の型：DNA

<213> ホモーサピエンス

<400> 配列

AATTCGGCAC	GAGCTCTCTG	AGGCTCGGCC	AAGACCTGAA	GCGGCGGACC	GAGAGCCGG	60
GTCTGAGACT	GAGAGAGCAA	CGGAATGGAG	GCGGGTAGA	GGCGGAAACA	CAACCTGCAG	120
GGCCAGAGCG	AGGCCGAGA	AGGACGGCGG	CGTGAGGGGG	CGGGGCGCCG	AGCGCAGAA	180
GGCAGGCACG	AGGGCGAGC	GCGAGGCAGG	GCACGGCGCG	TGGCGTGAGA	CGGGGCGGGG	240
CGCGCGTATC	GGCGCCGCGG	CCGCGTGACG	CGTTTCAAA	TCTTCAACCG	CCGCAGCCCA	300
CTCGTTGTG	CTTGCGCCT	TCCTCCTCCG	CGCCTGGAG	CCGGATCCGG	CCCCGGAAAC	360
CCGACCTGCA	GACGCGGTAC	CTCTACTGGG	TAGAGGCCGT	AGCTGGCGGA	AGGAGAGAGG	420
CGGCCGTCT	GTCAACAGGC	CGGGGGAAGC	CGTGCTTCG	CGGCTGCCCG	GTGCGACACT	480
TTCTCCGGAC	CCAGCATGTA	GGTGCCGGGC	GAUTGCCATG	AACTCCGGAG	CCATGAGGAT	540
CCACAGTAAA	GGACATTCC	AGGGTGGAAAT	CCAAGTCAAA	AATGAAAAAA	ACAGACCATC	600
TCTGAAATCT	CTGAAAATG	ATAACAGGCC	AGAAAAATCC	AAATGTAAGC	CACTTGGGG	660
AAAAGTATTT	TACCTTGACT	TACCTTCTGT	CACCATATCT	AAAAAACTTC	AAAAGGACAT	720
TAAGGATCTG	GGAGGGCGAG	TTGAAGAATT	TCTCAGCAAA	GATATCAGTT	ATCTTATTTC	780
AAATAAGAAG	GAAGCTAAAT	TTGCACAAAC	CTTGGGTGCA	ATTCTCCTG	TACCAAGTCC	840
AGAATCTGCA	TATACTGCAG	AAACCACCTTC	ACCTCATCCC	AGCCATGATG	GAAGTTCATT	900
TAAGTCACCA	GACACAGTGT	GTTTAAGCAG	AGGAAAATTA	TTAGTTGAAA	AAGCTATCAA	960
GGACCATGAT	TTTATTCCCT	CAAATAGTAT	ATTATCAAAT	GCCTTGTCAT	GGGGAGTAAA	1020
AATTCTTCAT	ATTGATGACA	TTAGATACTA	CATTGAACAA	AAGAAAAAAG	AGTTGTATTT	1080
ACTCAAGAAA	TCAAGTACTT	CAGTAAGAGA	TGGGGCAAA	AGAGTTGGTA	GTGGTGCACA	1140
AAAAACAAGA	ACAGGAAGAC	TCAAAAAGCC	TTTGTAAAG	GTGGAAGATA	TGAGCCAAAG	1200
CCCTGCAGTC	CATTGATGT	AGACAAGCCA	TCTAGTATGC	AAAAGCAAAC	TCAGGTTAAA	1260
CTAAGAATCC	AAACAGATGG	CGATAAGTAT	GGTGGAACCT	CAATTCAACT	CCAGTTGAAA	1320
GAGAAGAAGA	AAAAAGGATA	TTGTGAATGT	TGCTTGCAGA	AATATGAAGA	TCTAGAAACT	1380
CACCTTCTAA	GTGAGCAACA	CAGAAACTTT	GCACAGAGTA	ACCAAGTATCA	AGTTGTTGAT	1440
GATATTGTAT	CTAAGTTAGT	TTTGACTTT	GTGGAATATG	AAAAGGACAC	ACCTAAAAAAG	1500
AAAAGAATAA	AATACAGTGT	TGGATCCCTT	TCTCCTGTIT	CTGCAAGTGT	CCTGAAAAAAG	1560
ACTGAACAAA	AGGAAAAAAGT	GGAATTGCAA	CATATTCTC	AGAAAGATTG	CCAGGAAGAT	1620
GATACAACAG	TGAAGGAGCA	GAATTCCTG	TATAAAGAGA	CCCAGGAAAC	TGAAAAAAAG	1680

CTCCTGTTA TTTCAGAGCC CATCCCCAC CCTTCAAATG AATTGAGAGG GCTTAATGAG	1740
AAAATGAGTA ATAAATGTT CATGTTAAGT ACAGCTGAAG ATGACATAAG ACAGAATTT	1800
ACACAGCTAC CTCTACATAA AAACAAACAG GAATGCATT C TTGACATTTC CGAACACACA	1860
TTAAGTAAAA ATGACTTAGA AGAACTAAGG GTAGATCACT ATAAATGTAA CATAACAGGCA	1920
TCTGTACATG TTTCTGATT CAGTACAGAT AATAGTGGAT CTCAACCAAA ACAGAAGTCA	1980
GATACTGTGC TTTTCCAGC AAAGGATCTC AAGGAAAAGG ACCTTCATT C AATATTTACT	2040
CATGATTCTG GTCTGATAAC AATAAACAGT TCACAAGAGC ACCTAACTGT TCAGGCAAAG	2100
GCTCCATTCC ATACTCCTCC TGAGGAACCC AATGAATGTG ACTTCAAGAA TATGGATAGT	2160
TTACCTTCTG GTAAAATACA TCGAAAAGTG AAAATAATAT TAGGACGAAA TAGAAAAGAA	2220
AATCTGGAAC CAAATGCTGA ATTTGATAAA AGAACTGAAT TTATTACACA AGAAGAAAAC	2280
AGAATTGTA GTTCACCGGT ACAGTCTTA CTAGACTTGT TTCAGACTAG TGAAGAGAAA	2340
TCAGAATTTC TGGGTTTCAC AAGCTACACA GAAAAGAGTG GTATATGCAA TGTTTAGAT	2400
ATTTGGGAAG AGGAAAATTC AGATAATCTG TTAACAGCGT TTTCTCGTC CCCTTCAACT	2460
TCTACATT TA CTGGCTTTA GAATTAAAAA AATGCATACT TTTCAGAAGT GATAAGGATC	2520
ATATTCTG A ATT TTATA AATATGTATG GAAATTCTTA GGATTTTT ACCAGCTTG	2580
TTTACAGACC CAAATGTAAA TATTAAAAAT AAATATTGC AATTTCTAC AGAATTGAAT	2640
ACCTGTTAAA GAAAATTAC AGAATAAACT TGTGACTGGT CTTGTTTAC ATTAAAAAAA	2700
AAAAAAAAAA AAAACTCGAG	2719

【図面の簡単な説明】

【図1】

動物細胞で発現させたhuCdc7とH3.7の共免疫沈降を測定したウェスタンブロッティングの結果である。レーン1-4：免疫沈降物、レーン5-7：細胞総抽出液、上段および中段：huCdc7抗体No.1により免疫沈降したもの、下段：myc抗体により免疫沈降したもの。抽出液は、huCdc7とH1（レーン2、5）、H1.8（レーン3、6）H3.7（レーン4、7）またはhuCdc7のみ（レーン1）をトランスフェクションしたCos7細胞から作成した。ウェスタンブロッティングは、抗myc抗体（上段）または抗huCdc7抗体No.1（中段および下段）を用いて行った。

【図2】

H37タンパク質に対する抗体と細胞内における内在性huCdc7とH37との会合を測定したウェスタンブロッティングの結果である。myc 標識したH37をトランスフェクションしたCos7から作成した核抽出液を、抗H37C抗体（レーン1）、抗H37N抗体（レーン2）、抗H37C pep 抗体（レーン3）あるいは抗myc 抗体（レーン4）によりプロットした。矢印は、myc タグに加えて5' 非コード領域に由来する63アミノ酸を含んでいるH37タンパク質の位置を示している。CEM細胞から作成した抽出液を抗huCdc7 C-pep抗体（レーン5、6）、あるいは抗H37C-pep抗体（レーン7、8）により免疫沈降し、タンパクゲル電気泳動したのち、huCdc7モノクローナル抗体（4A8）を用いてプロットした。-と+は、免疫沈降の際にそれぞれの抗原が存在するか否かを示している。レーン9-13はHeLa細胞の核抽出液のウェスタンブロッティングであり、抗huCdc7抗体No.1（レーン9）、抗huCdc7モノクローナル抗体4A8（レーン10）、抗H37C抗体（レーン11）、抗H37N抗体（レーン12）、抗H37C-pep抗体（レーン13）を用いている。

【図3】

抗huCdc7抗体No.1（レーン1-5）または抗myc 抗体（レーン6-10）を用いてmyc 標識H37のみ（レーン1、6）、myc 標識H37と野生型huCdc7（レーン2、7）、myc 標識H37とキナーゼ失活型huCdc7（レーン3、8）をトランスフェクションしたCos7細胞の抽出液から免疫沈降を行った結果を示す。コントロールとして野生型huCdc7のみ（レーン4、9）およびキナーゼ失活型huCdc7（レーン5、10）も同様に測定した。

【図4】

野生型huCdc7の共発現により誘導されるH37の電気泳動上での移動度の変化である。野生型またはキナーゼ失活型のhuCdc7をmyc 標識H37とともに発現しているCos7細胞から抽出液を作製し、抗huCdc7抗体No.1（レーン1、2）または抗myc 抗体（レーン3、4）で免疫沈降し、抗myc 抗体（上段）または抗huCdc7抗体（下段）でプロットした。試料は8% SDS-PAGEタンパクゲルに流した。

【図5】

配列番号1と同一の全長H37タンパク質のアミノ酸配列である。

【図6】

D_{bf}4とH37の構造を比較した模式図と2つの保存領域のアミノ酸配列の比較である。D_{bf}4上の両向きの矢印で示された領域は、Cdc7との相互作用に充分であると報告されている領域である。H37上の両向き矢印で示された領域は、それぞれhuCdc7との相互作用に必須である（しかし充分ではない）領域と、huCdc7キナーゼ活性の促進に充分な領域を示す。

【図7】

H37タンパク質のN端およびC端欠失変異の模式図である。それぞれのバー端部の数字は欠失の端のアミノ酸番号（配列番号1に対応）を示す。斜線領域はD_{bf}4モチーフCを示す。

【図8】

H37欠失変異体のhuCdc7とのtwo-hybridアッセイにおけるlacZ活性を示す。

【図9】

H37欠失変異体の一部をhuCdc7とともにCOS7細胞内に共発現し、huCdc7タンパク質と複合体を形成するかを抗体共沈法により検討した結果を示す。

【図10】

aは種々の臓器でのH37mRNA発現のサザン解析の結果であり、bは種々の癌細胞でのH37mRNA発現のノザン解析の結果である。

【図11】

休止期にあるWI38細胞を10%血清添加により増殖刺激し、様々な時間経過においてそのDNA含量をFACSで解析した結果を示す。

【図12】

図11に示した細胞からRNAを抽出し、H37およびhuCdc6の発現をノザン解析した結果（上段）と、それぞれのmRNAの相対的発現量を示したグラフ図（中、下段）である。

【図13】

エルトリエーション法によるヒトCEM細胞の各細胞周期分画を示したグラフ

図である。

【図14】

図13に示した各分画のH37およびCyclin Eの発現をノザン解析した結果（上段）と、それぞれのmRNAの相対的発現量を示したグラフ図（中、下段）である。

【図15】

ノコダゾールによりHeLa細胞をG2後期に停止させ、同調的に細胞周期を移行させた場合のDNA含量をFACSで解析した結果を示す。

【図16】

図15に示した各細胞周期におけるH37およびCyclin Eの発現をノザン解析した結果（上段）と、それぞれのmRNAの相対的発現量を示したグラフ図（中、下段）である。

【図17】

間接蛍光抗体法によるH37の細胞局在の解析結果を示す。使用した抗体は、抗H37C抗体（A）、抗H37N抗体（C）、コントロール抗体（E）、B、D、FはDAPI染色像である。

【図18】

血清刺激後のKD細胞におけるDNA合成の誘導の時間的变化をBrdU取り込み量を指標として調べた結果を示す。

【図19】

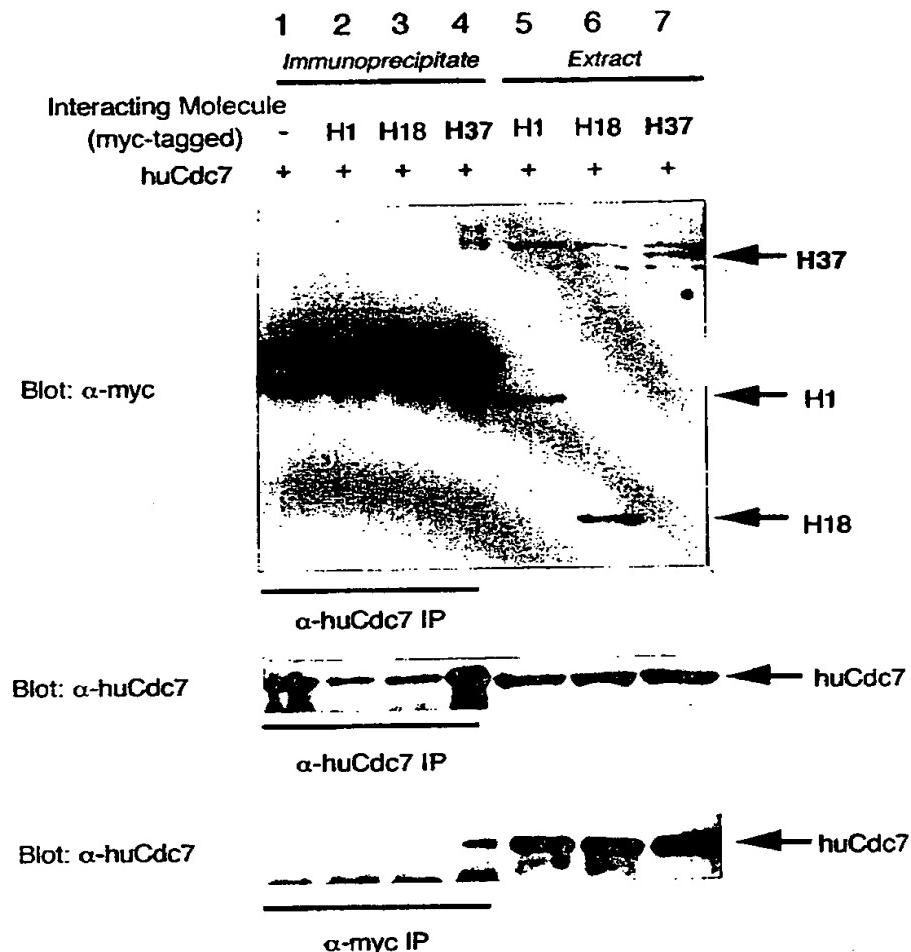
血清飢餓により同調したKD細胞に、血清添加後12時間の時点で各抗体を微注入し、さらに16時間後にBrdU取り込み量を測定して計測したDNA合成を行っている細胞の割合を示す。

【図20】

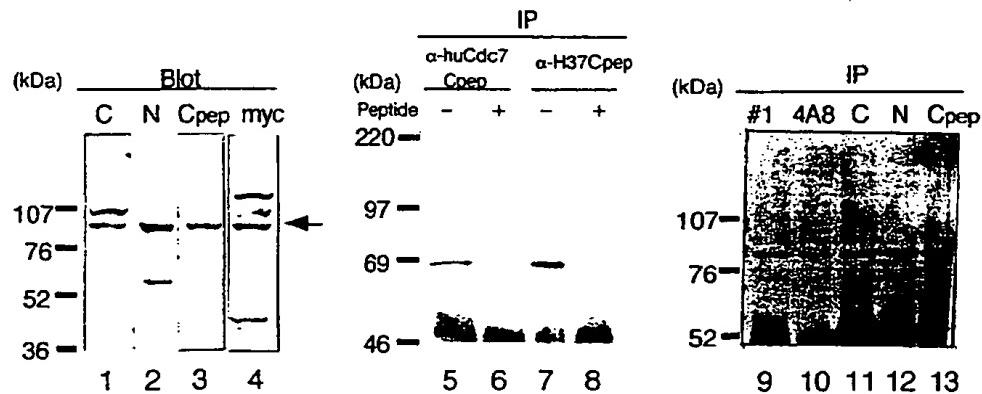
抗H37C-pep抗体（左側）または抗H37C-pepとペプチドの混合物を微注入された細胞を例示した顕微鏡写真である。取り込まれたBrdU（上段）、注入された抗体（中段）、細胞（下段）を示す。

【書類名】 図面

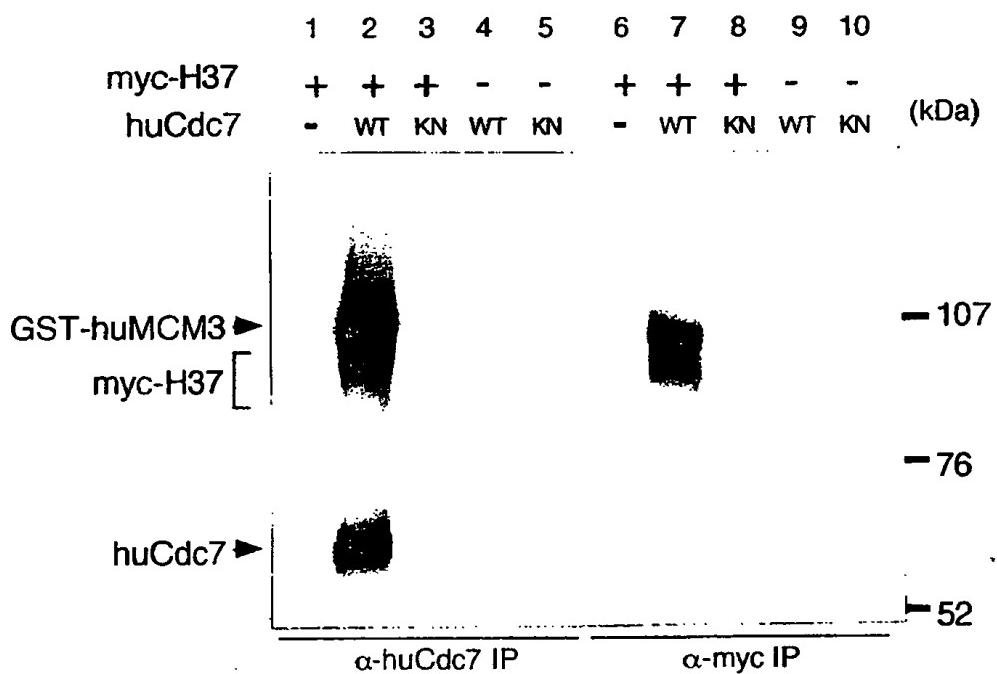
【図 1】



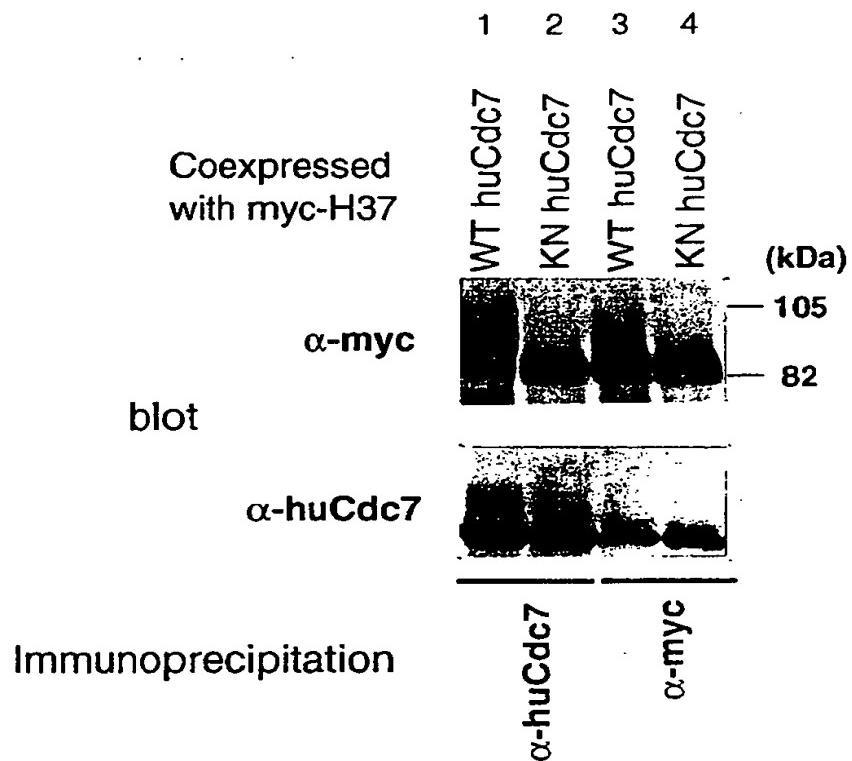
【図2】



【図3】



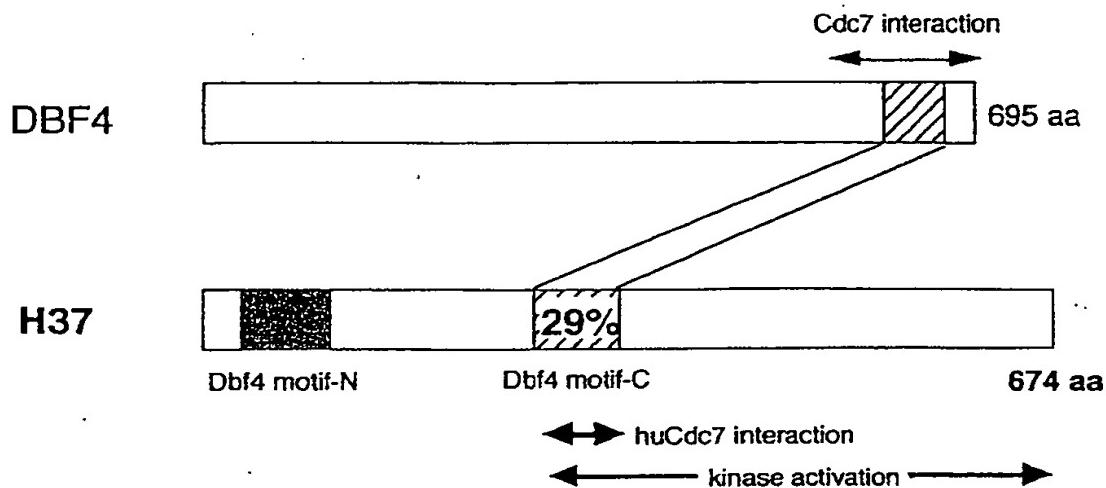
【図4】



【図5】

1	10	20	30	40	50	60
MNSGAMRIHSKGHFGGGIQVKNEKNRPSL KSLKTDNRPEKSCKPLWGKVFYLDLPSVTI						
61	70	80	90	100	110	120
SEKLOKDIKDLGGRVEEFLSKDISYLISNKKEAKFAOTLGRISPVPSPESAYTAETTSPH						
121	130	140	150	160	170	180
PSHDGSSFKSPDTVCLSRGKLLVEKA I KDHDFIPSNSILSNALSGVGKIL H DDIRYYIE						
181	190	200	210	220	230	240
QKK E LYLLKKSSSTSVRDGGKRVGSGAQ K TRTGR L KKPFV K VEDMSQLYRPFY L QLTNMP						
241	250	260	270	280	290	300
FINYSIQKPCSPFDVKPSSMQ O T O V K L R I O T D GDKYGGTS I QL Q LEKKKG C ECCL						
301	310	320	330	340	350	360
Q KY E DL E TH L LS E Q H R N F A QS N Q Y Q V DD I V S KL V F D F V E Y E K D T P KK R I K Y S V GS L SP						
361	370	380	390	400	410	420
VSASV L K T E Q KE K VEL Q HS I Q K DC Q ED D TT V KE Q NFLY K ET Q E T E K LL F ISE P IP H PS						
421	430	440	450	460	470	480
NEL R GL N E K MS N K C MS L STA E DD I R Q NFT Q LP L H K N K Q E C I LD I SE H T L SEN D LE E EL R VD						
481	490	500	510	520	530	540
HYKC N I Q A S V H V S DF S TD N GS Q PK Q SD T V L F P AK D L K E K DL H S I F T H D SG L IT I N SS Q						
541	550	560	570	580	590	600
EH L TV Q A K AP F H T P PE P N E C DF K N M DS L PS G K I HR K V K I I L G R N R K EN L E P NA E FD K RT						
601	610	620	630	640	650	660
EF I T Q E E N R I C SS P V Q S L LD L F Q T S EE K S E FL G FT S YE K SG I C N V L DI W EE E NS D N L LT						
661	670	674				
AFFSSPSTSTFTGF*						

【図 6】



Dbf4 motif-N

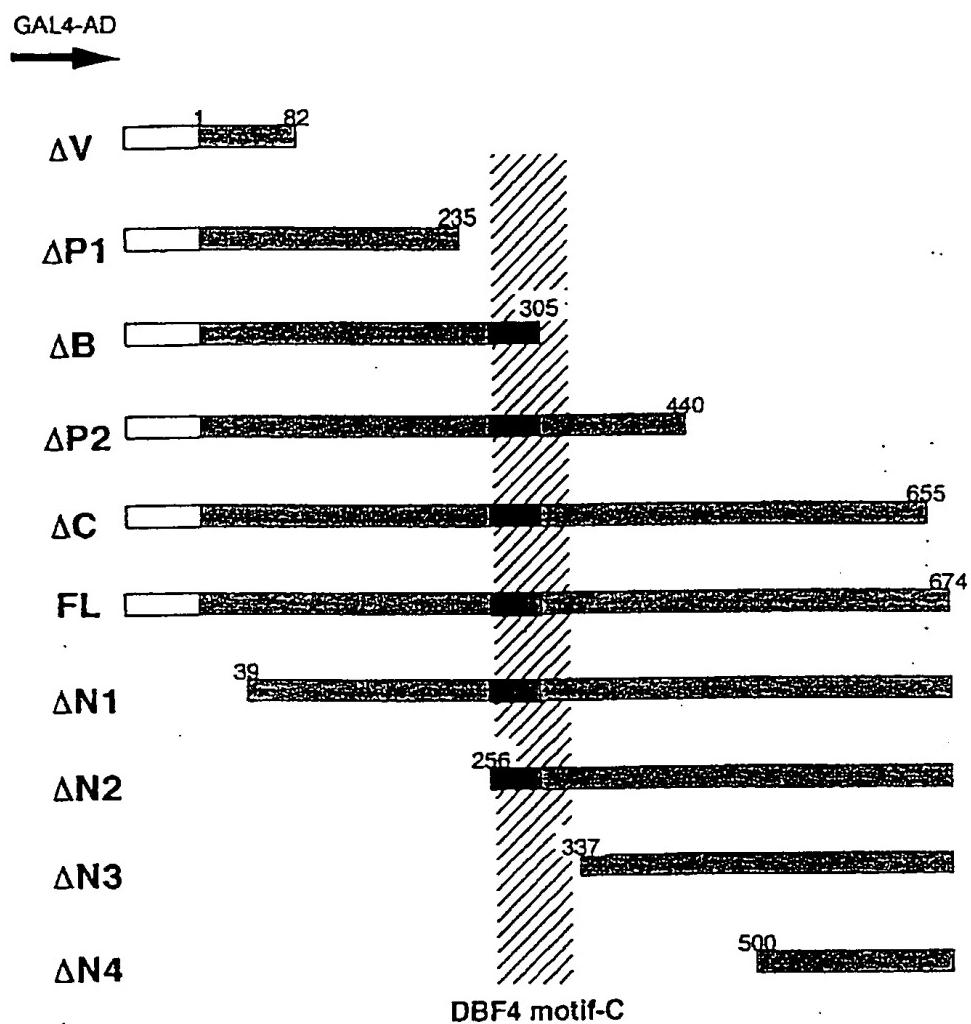
H37 32: LKTIDNREKSKNCKPLNGKVEYI-DLPSVITI SEKIOKDIDKLGGRVIEEFLSKDTSYLISNKK 91
 mu-H37 :LKADNRLEKSKYKPLNGKVEYI-DLPSVITI SEKIOKDIDKLGGRVIEEFLSKDTSYFVSNKK
 Dm-H37 :TPPKVKVIKSKR-PPLCHFKVEYI-DLPSVITI SEKIOKDIDKLGGRVIEEFLSKDTSYFVSNKK

huDbf4N 92 EAKFAQT 98
muDbf4N EAKFAQT
DmDbf4N EVIGGTS

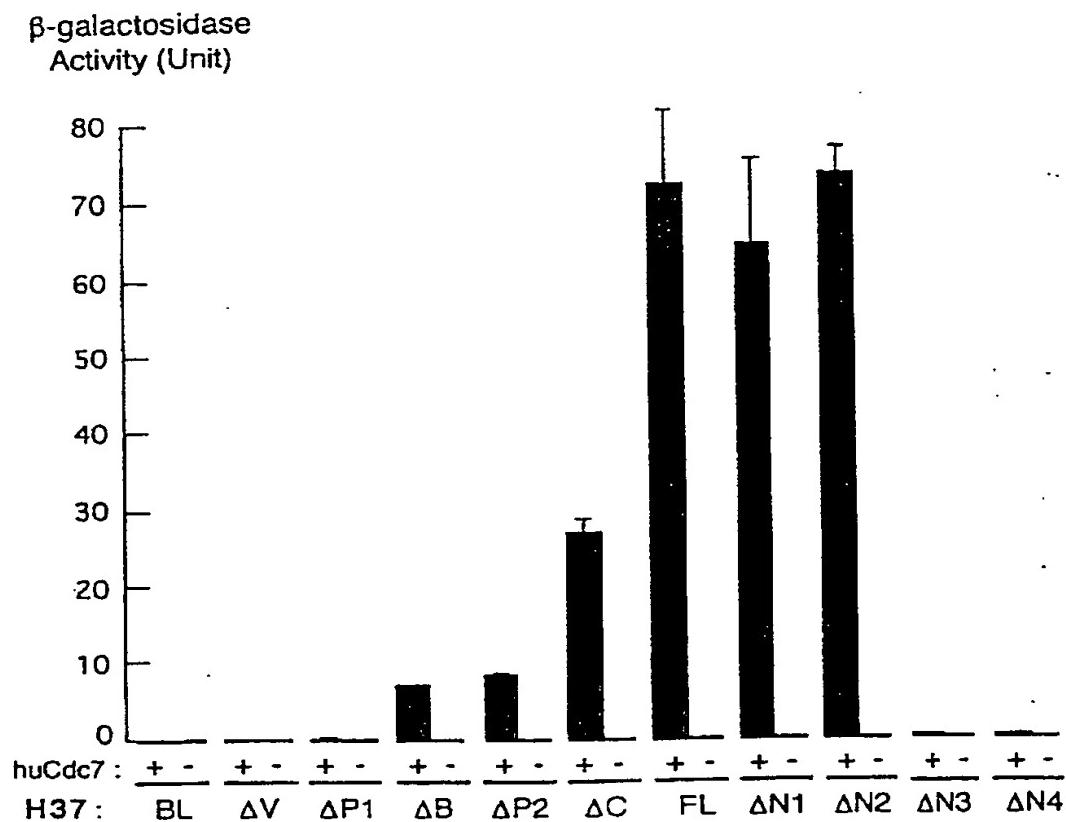
Dbf4 motif-C

H37	263	-KQTQVKLRIQTDGDKYGGTSIQLQLKEKKKGTYCFCCLQKYEDELETHLLSECFRFAQSN-	322
mu-H37		-EKQACPPLRINMDGDKC-GTPVQLKLKEKRKGTYCFCCLQKYEDELETHLLSECFRFAQSN-	
Dm-H37		-PSLQELKKQSAIPNSPRSNCREPIDSSERQCCMCEDEKLEYDILNIIHQSKDPELFAKNS-	
Dbf4	619	-KKSTSTNVTLHFNAQTAIAQPVVKETVKNNSGYCHNCRVRYKESLEQHIVSIXHLFAE-N	677

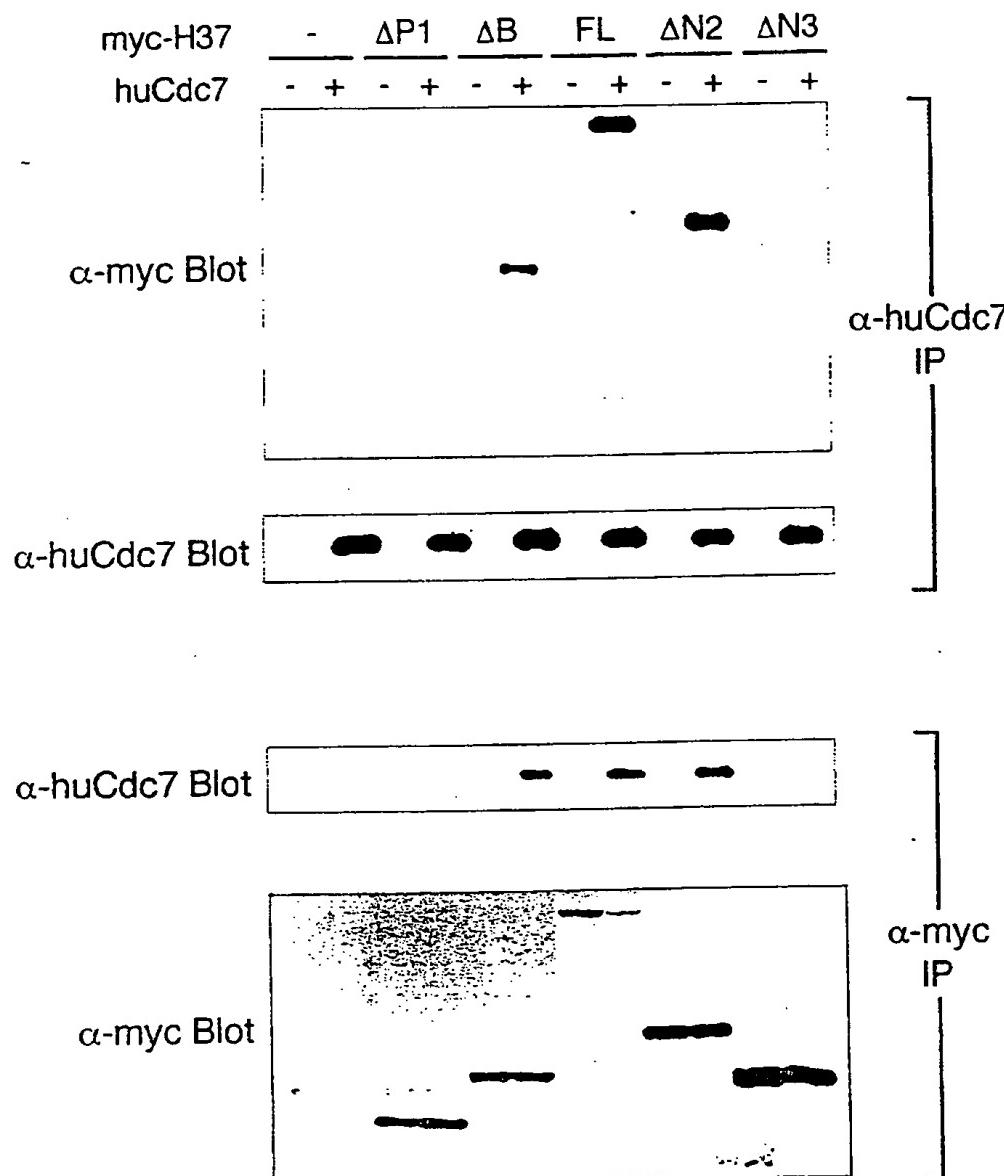
【図7】



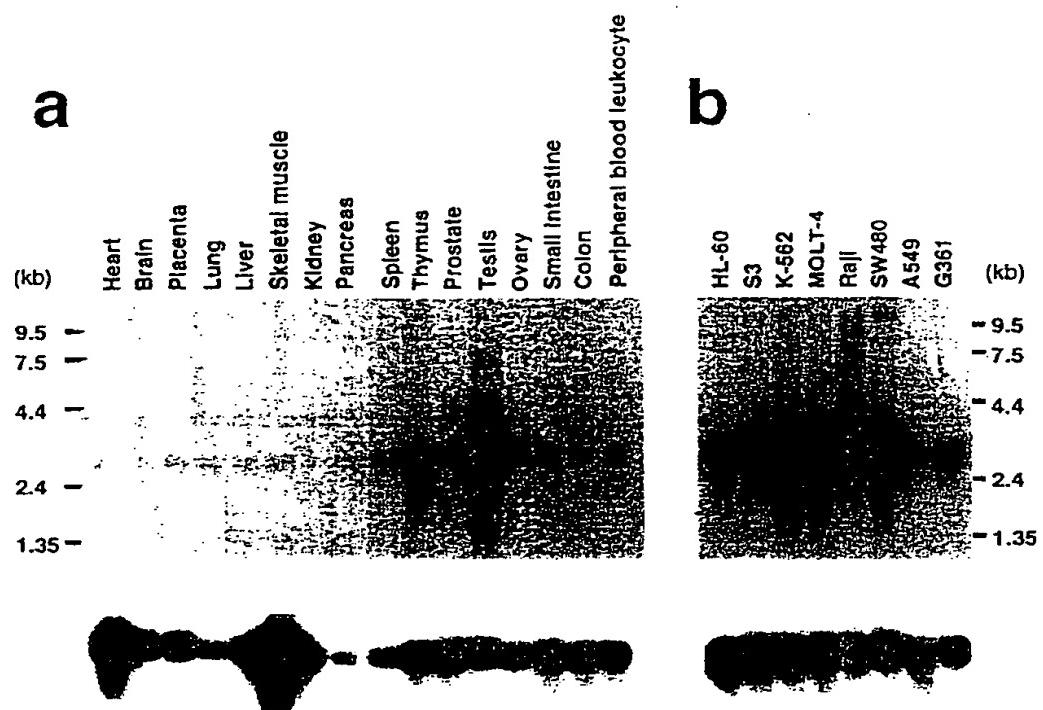
【図8】



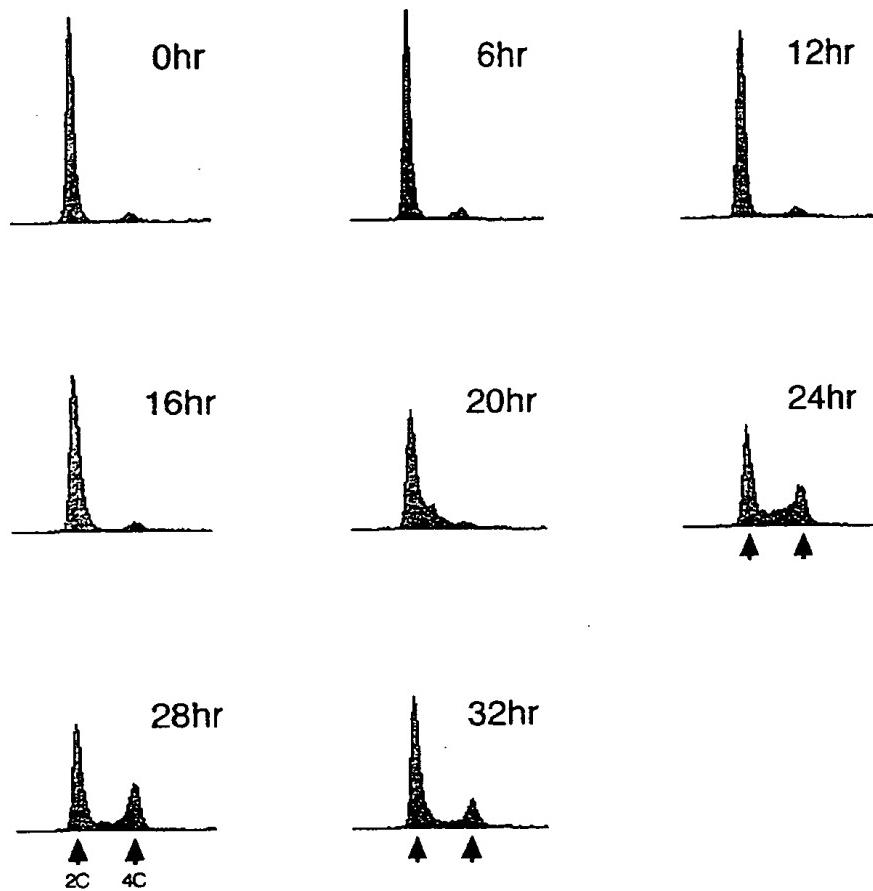
【図9】



【図10】

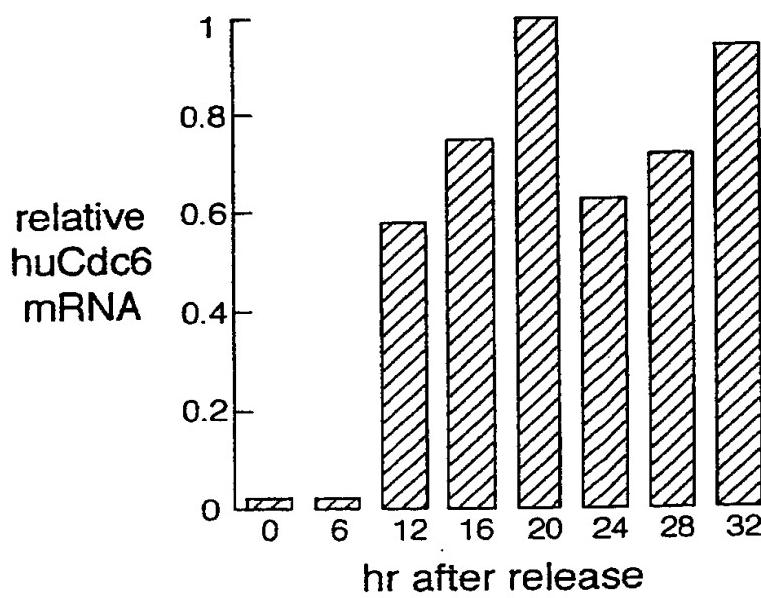
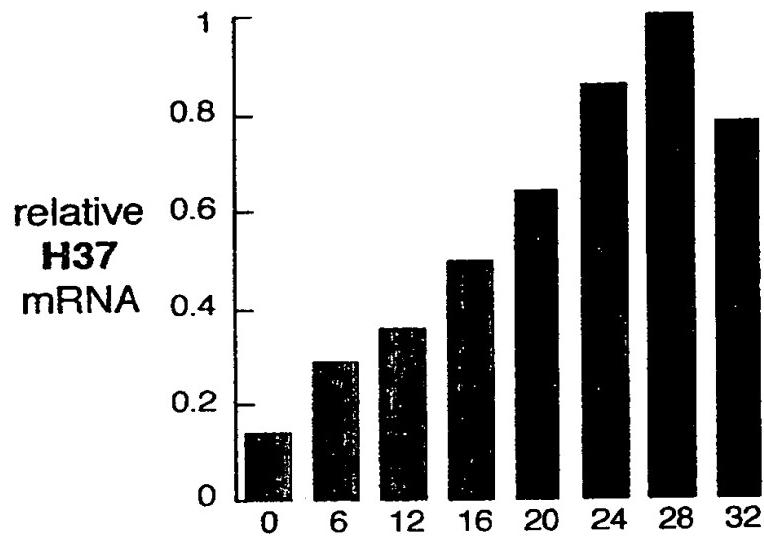


【図11】

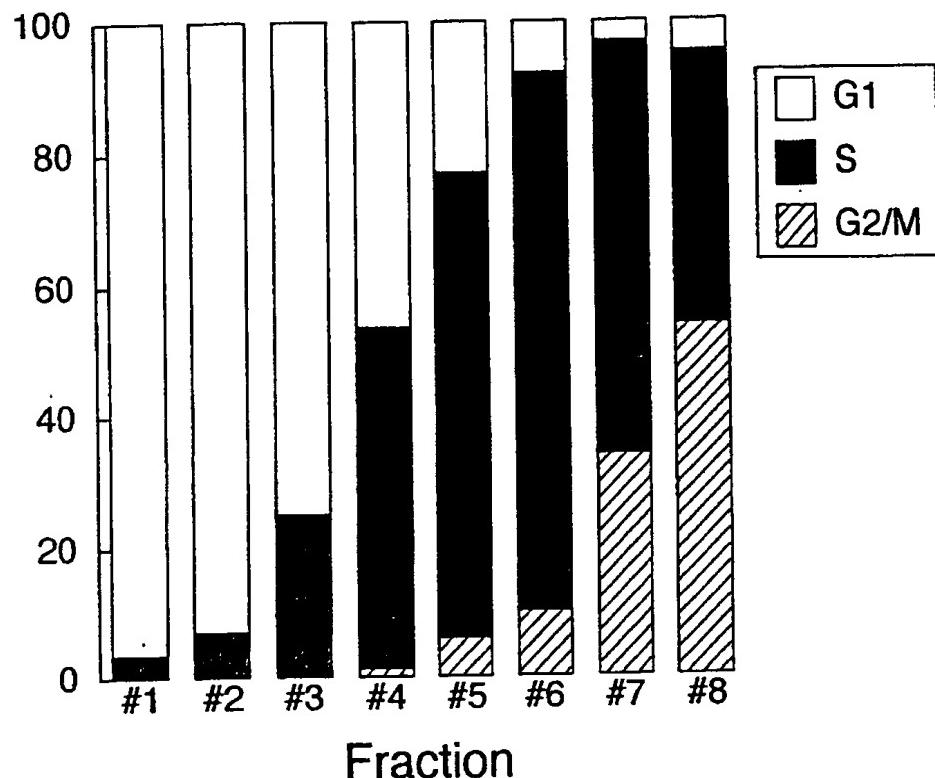


【図12】

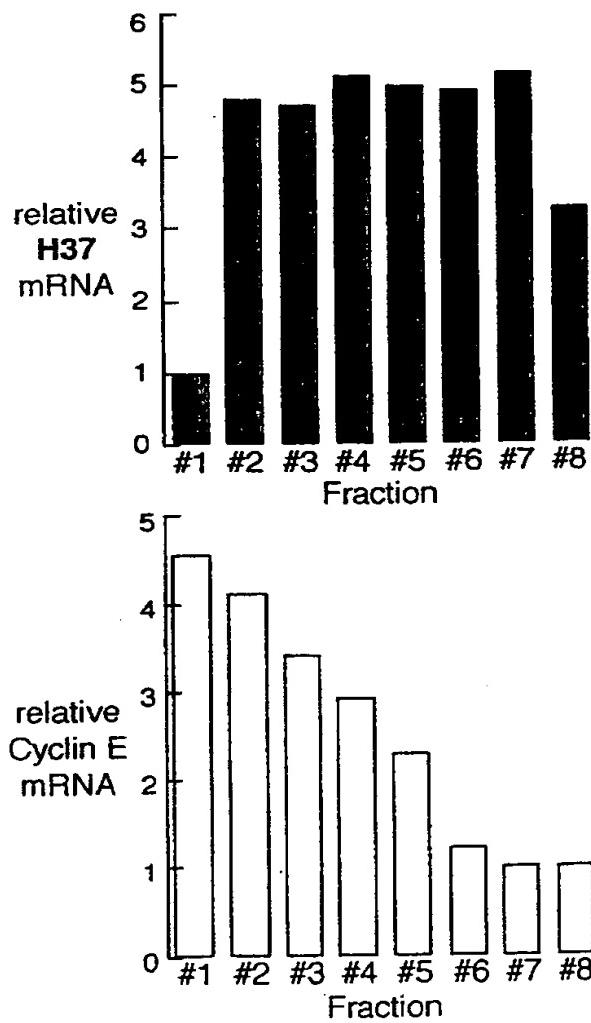
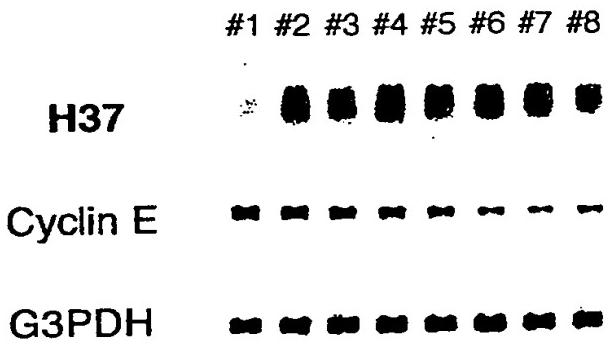
特平 1 0 - 3 1 1 4 0 8



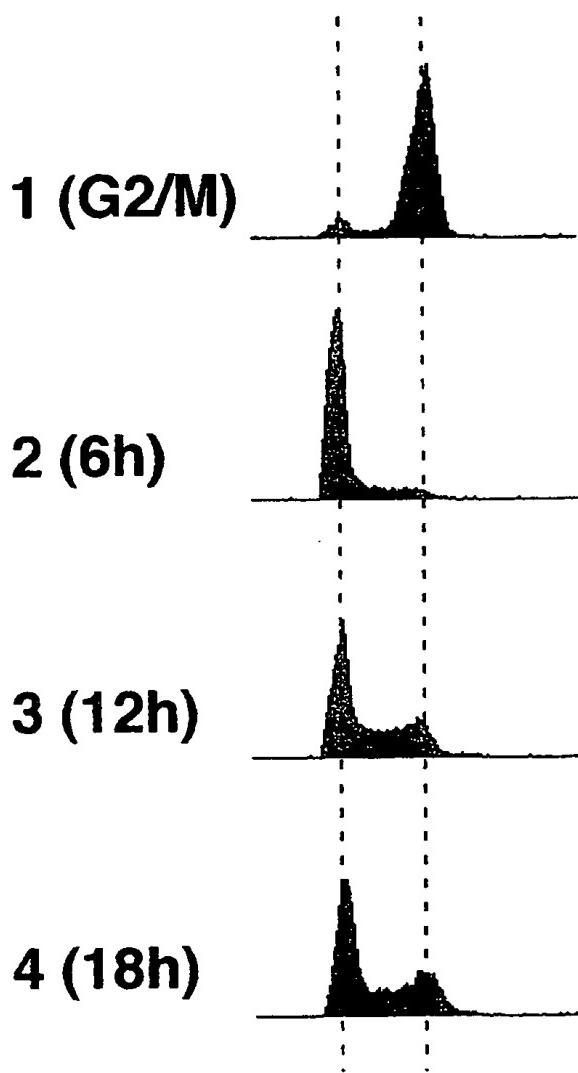
【図13】



【図14】

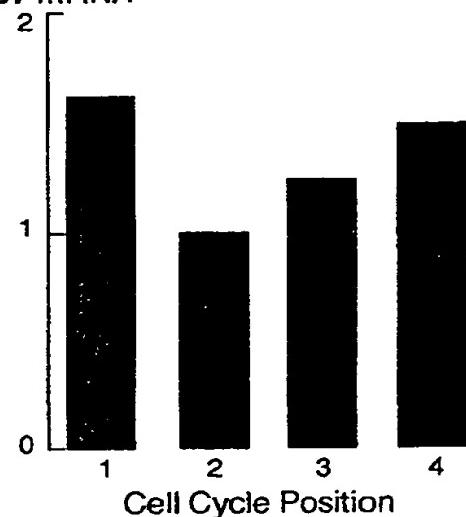
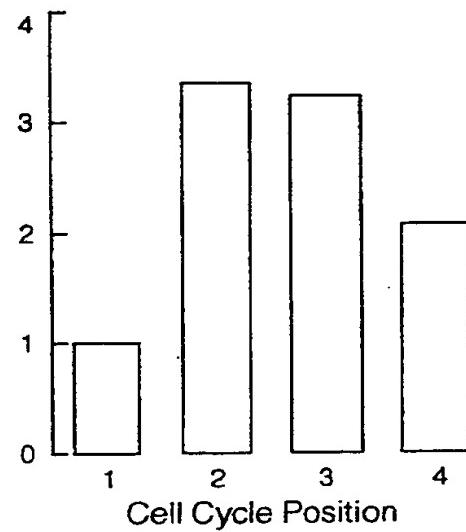


【図15】

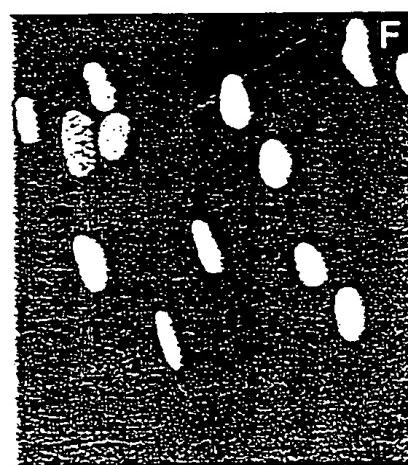
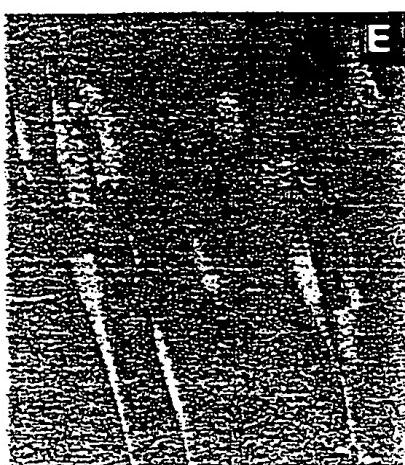
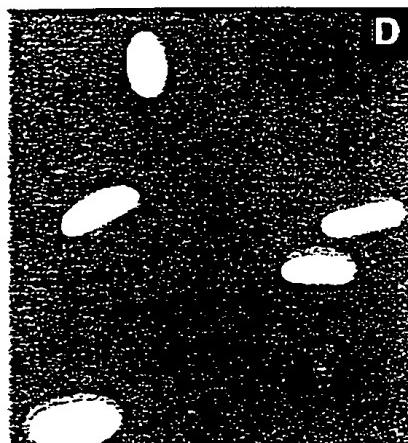
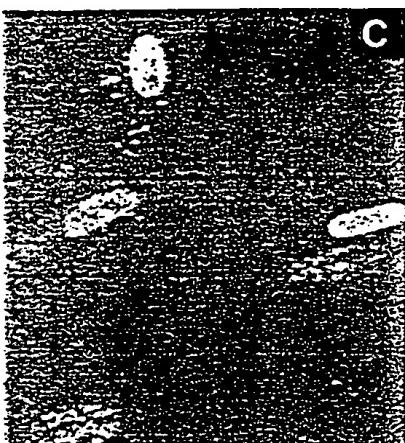
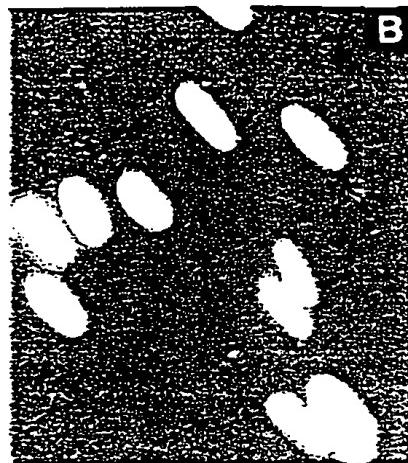
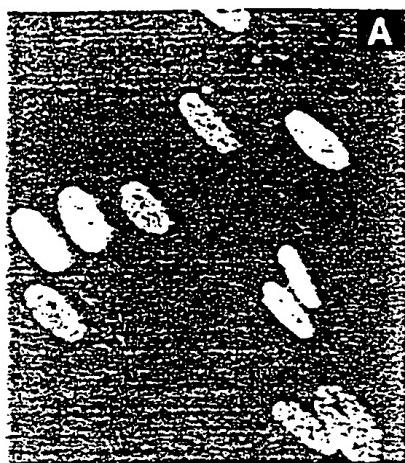


【図16】

1 2 3 4

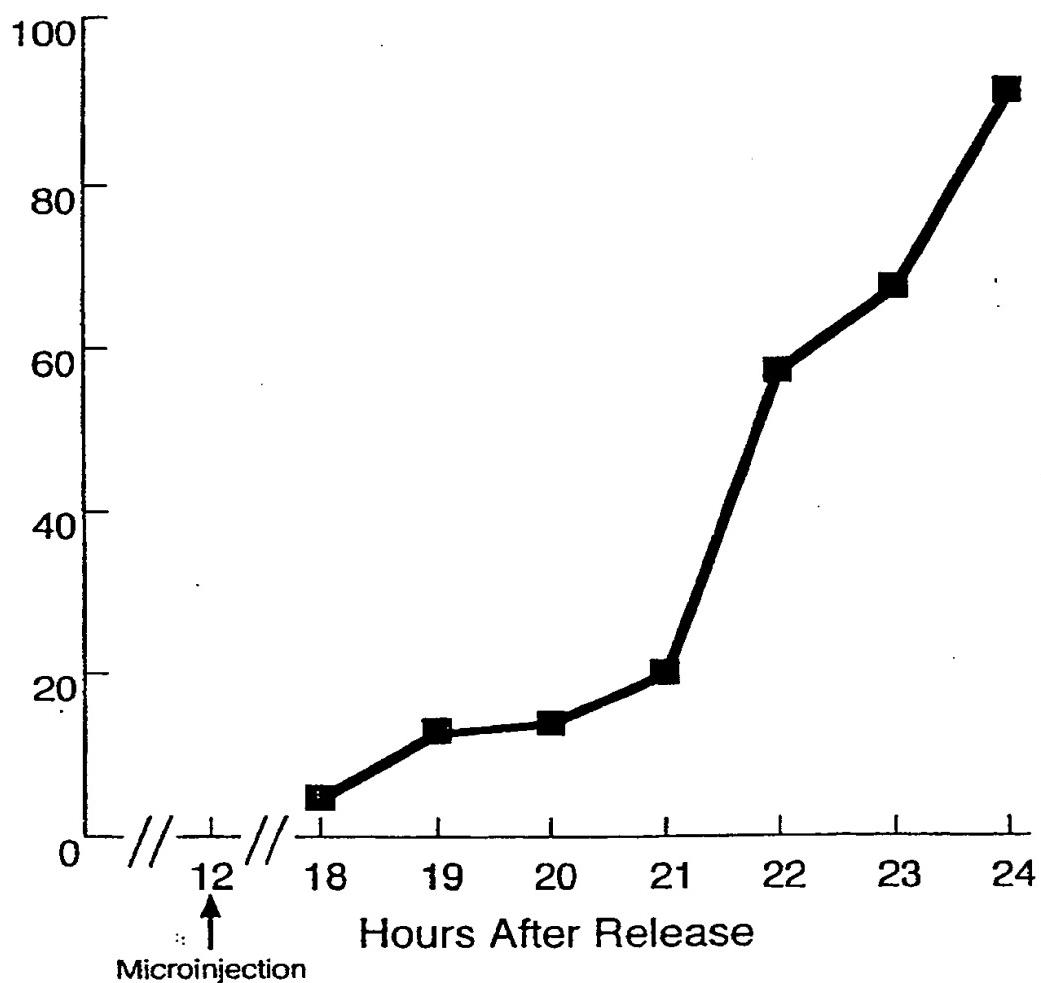
H37**Cyclin E****G3PDH**relative
H37 mRNArelative
Cyclin E mRNA

【図17】

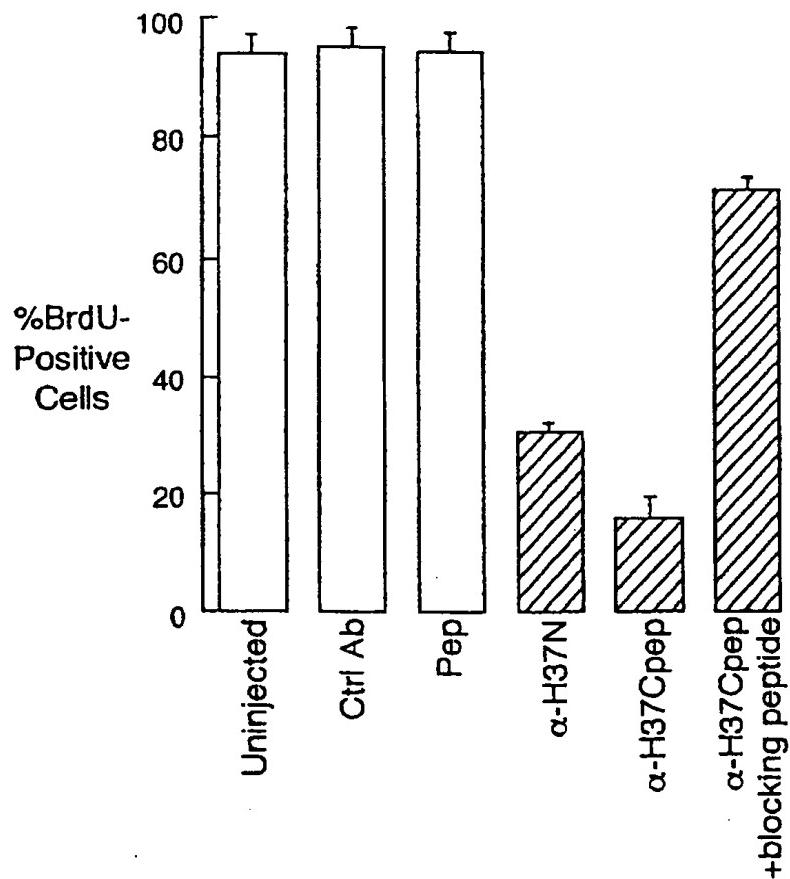


【図18】

%BrdU-Positive Cells

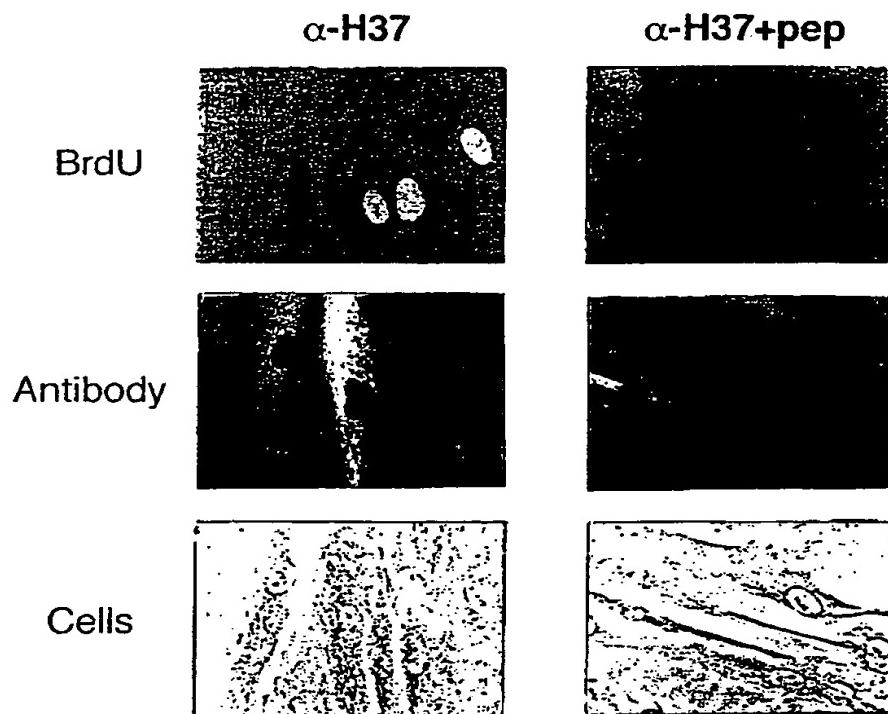


【図19】



【図20】

Microinjection with



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヒト細胞の複製を制御するタンパク質Cdc7の活性制御サブユニットであるヒトH37タンパク質と、このタンパク質をコードするヒト遺伝子およびそのcDNA、H37タンパク質に対する抗体、並びにこれらの遺伝子工学材料や抗体を用いてヒト細胞の増殖を制御する方法を提供する。

【解決手段】 配列番号1または2で表されるアミノ酸配列を有するヒトH37タンパク質、上記のヒトH37タンパク質をコードするヒト遺伝子、このヒト遺伝子のcDNAであって、配列番号3または4の塩基配列を有するcDNA、これらcDNAの一部配列からなるDNA断片、上記cDNAを保有する組換えベクター、ヒトH37タンパク質に対する抗体、並びに上記DNAまたは抗体を細胞内に導入することによる細胞増殖制御方法。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
 【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 396020800
 【住所又は居所】 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【特許出願人】

【識別番号】 598150569
 【住所又は居所】 東京都目黒区目黒1-9-206
 【氏名又は名称】 新井 賢一

【特許出願人】

【識別番号】 598150570
 【住所又は居所】 東京都港区三田5-7-8 シャンボール三田62
 0号
 【氏名又は名称】 正井 久雄

【代理人】

【識別番号】 100093230
 【住所又は居所】 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階
 西澤国際特許事務所
 【氏名又は名称】 西澤 利夫

出願人履歴情報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日 1998年 2月24日

[変更理由] 名称変更

住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名 科学技術振興事業団

出願人履歴情報

識別番号 [598150569]

1. 変更年月日 1998年10月30日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都目黒区目黒1-9-6-206

氏 名 新井 賢一

出願人履歴情報

識別番号 [598150570]

1. 変更年月日 1998年10月30日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都港区三田5-7-8 シャンボール三田620号

氏 名 正井 久雄